

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DPTO. DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA



# **EFEECTO DE ALTAS CONCENTRACIONES DE D-GLUCOSA SOBRE LA ADHESION LEUCOCITARIA EN CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS**

Memoria que para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas  
presenta

**VERÓNICA AZCUTIA CRIADO**

Directores

**Dr. Carlos Sánchez Ferrer**

Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid

**Dra. Concepción Peiró Vallejo**

Profesora Contratada de la Universidad Autónoma de Madrid

**MADRID, 2008**

Este trabajo ha sido parcialmente subvencionado con ayudas del Ministerio de Educación y C (SAF2004-02440, SAF2005-01405 y SAF2008-0942), de la Comunidad Autónoma de Madrid-Universidad Autónoma de Madrid (CCG07-UAM/BIO-1595), de la Red Temática RETICEF (RD06/0013), de la Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña y de la Sociedad Española de Farmacología-Almirall Prodesfarma, y mediante la concesión de una beca de Postgrado para la Formación de Profesorado Universitario de la Universidad Autónoma de Madrid.

## *Índice*

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Summary</b>	<b>3</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>5</b>
<b>Introducción</b>	<b>9</b>
<i>DIABETES MELLITUS</i>	10
<i>Prevalencia de la diabetes</i>	10
<i>COMPLICACIONES VASCULARES ASOCIADAS A DIABETES</i>	11
<i>DISFUNCIÓN ENDOTELIAL</i>	13
<i>DIABETES COMO ENFERMEDAD INFLAMATORIA</i>	15
<i>TRANSPORTADOR DE GLUCOSA-1 (GLUT-1)</i>	19
<i>ATEROSCLEROSIS</i>	22
<i>PROCESO DE RODAMIENTO LEUCOCITARIO</i>	24
<i>MOLÉCULAS DE ADHESIÓN</i>	26
<i>Selectinas</i>	28
<i>Integrinas</i>	29
<i>Superfamilia de las inmunoglobulinas</i>	32
<i>Molécula de Adhesión Intercelular 1 (ICAM-1)</i>	33
<i>Molécula de Adhesión de Células Vasculares-1 (VCAM-1)</i>	35
<i>PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPKs)</i>	36
<i>Quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK)</i>	39
<i>FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR-<math>\kappa</math>B (NF-<math>\kappa</math>B)</i>	40
<b>Objetivos</b>	<b>44</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>46</b>
<i>Obtención de cultivos celulares</i>	47
<i>Caracterización celular</i>	49
<i>Protocolo experimental en cultivo celular</i>	49



<i>Citometría de flujo</i>	50
<i>Inmunofluorescencia indirecta</i>	52
<i>Western blot</i>	53
<i>Preparación de extractos nucleares</i>	55
<i>Ensayos de retardo en gel (EMSA)</i>	56
<i>Captación de [<sup>3</sup>H]2-deoxiglucosa</i>	58
<i>Adhesión leucocitaria en cámara de flujo.</i>	60
<i>Protocolo experimental in vivo</i>	62
<i>Microscopía intravital</i>	62
<i>Materiales</i>	64
<i>Análisis estadístico</i>	65
<b>Resultados</b>	<b>66</b>
<i>CARACTERIZACIÓN CELULAR</i>	67
<i>EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN ICAM-1 Y VCAM-1 EN HUVEC.</i>	67
<i>Determinación de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en la superficie celular.</i>	67
<i>Estudios de citometría de flujo</i>	67
<i>Estudios de Inmunolocalización</i>	69
<i>RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE ICAM-1 Y VCAM-1</i>	73
<i>Papel de ERK 1/2 en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en HUVEC</i>	73
<i>Activación de ERK 1/2</i>	73
<i>PD 98059 inhibe la expresión de VCAM-1 pero no de ICAM-1 en HUVEC</i>	76
<i>Actividad del factor de transcripción NF-<math>\kappa</math>B</i>	76
<i>Ensayos de activación de NF-<math>\kappa</math>B en HUVEC por retardo en gel (EMSA)</i>	76
<i>PDTC inhibe la expresión de VCAM-1 pero no de ICAM-1 en HUVEC</i>	79
<i>Inmunolocalización de NF-<math>\kappa</math>B en HUVEC</i>	82
<i>MODULACIÓN DE LA ENTRADA DE GLUCOSA AL INTERIOR CELULAR MEDIADA POR IL-1<math>\beta</math></i>	82
<i>Expresión del transportador de glucosa tipo 1 (GLUT-1) en HUVEC</i>	82
<i>Técnica de Western blot</i>	82
<i>Técnica de citometría de flujo</i>	86
<i>Técnica de inmunolocalización</i>	86

<i>Captación de [<math>H^3</math>]-2-deoxiglucosa en HUVEC</i>	91
<b>ESTUDIOS DE ADHESIÓN LEUCOCITARIA</b>	91
<i>Adhesión in vitro de leucocitos a las HUVEC bajo condiciones de flujo.</i>	91
<i>Ensayos de la adhesión y tráfico leucocitario in vivo mediante microscopía intravital.</i>	93
<i>Inmunolocalización de ICAM-1 y VCAM-1 en el tejido mesentérico</i>	99
<b>Discusión</b>	101
<i>Expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1. Adhesión y tráfico leucocitario al endotelio tras la elevación de la concentración de D-glucosa.</i>	102
<i>Activación de señalizadores de inflamación en células endoteliales humanas por IL-1<math>\beta</math> y su modulación por D-glucosa</i>	110
<i>Modulación de la expresión de GLUT-1 y de la entrada de glucosa por IL-1<math>\beta</math></i>	115
<b>Conclusiones</b>	121
<b>Conclusions</b>	124
<b>Bibliografía</b>	127

## *Resumen*

La vasculopatía diabética es la principal causa de morbi-mortalidad entre los pacientes diabéticos. La disfunción endotelial es un marcador temprano de estas complicaciones vasculares. La hiperglucemia característica de la diabetes parece desempeñar un papel relevante en la patogénesis de las complicaciones vasculares. Sin embargo, los mecanismos por los cuales la hiperglucemia causa el daño vascular no se conocen con exactitud. Actualmente, la diabetes mellitus es considerada como una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado en la que se han encontrado elevados niveles circulantes de diferentes marcadores inflamatorios. La adhesión y la migración leucocitaria a través del endotelio, que requieren la expresión de moléculas de adhesión (CAMs), representan un paso clave en el desarrollo de aterosclerosis, condición presente en diferentes enfermedades vasculares.

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar si la elevación de la concentración de D-glucosa promueve la aparición de lesiones ateroscleróticas a través de un efecto proinflamatorio directo en las células endoteliales. Los estudios *in vitro* mostraron que la mera elevación de la concentración de D-glucosa extracelular de 5,5 a 22 mM durante 18 h no incrementó la expresión de la molécula de adhesión (ICAM-1) o de la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1), cuantificada por citometría de flujo, en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) en cultivo. La citoquina proinflamatoria interleuquina (IL)-1 $\beta$  (0,1 a 10 ng/ml) incrementó la inducción de ambas CAMs de manera concentración dependiente. Sorprendentemente, la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidas por la IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) fue exacerbada en presencia de 22 mM de D-glucosa. Estos efectos no se debieron a cambios de la osmolaridad en el medio de cultivo, ya que L-glucosa no reprodujo los efectos producidos por D-glucosa. De forma similar, la elevación de D-glucosa no indujo la adhesión de leucocitos HL-60 a la monocapa de HUVEC *in vitro*, pero incrementó la adhesión inducida previamente por IL-1 $\beta$  medida en una cámara de flujo. También se exploraron otros marcadores de inflamación como son el factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK 1/2). Mientras que la elevación de D-glucosa no activó ninguno de estos dos factores, claramente intensificó la activación de NF- $\kappa$ B y ERK 1/2 inducida por IL-1 $\beta$ . Tanto ERK 1/2 como NF- $\kappa$ B están implicados en la expresión de VCAM-1 inducida por IL-1 $\beta$ , mientras que la expresión de ICAM-1 no está mediada por estas moléculas. Además de los marcadores de inflamación, la IL-1 $\beta$  incrementó la expresión de GLUT-1, determinados por Western blot y citometría de flujo. La elevación de D-glucosa no modificó los niveles de GLUT-1 pero incrementó la inducción de GLUT-1 mediada por IL-1 $\beta$ .

Para investigar la interacción entre la elevación de D-glucosa y la IL-1 $\beta$  en un modelo *in vivo* más complejo, se evaluó el tráfico leucocitario en la microcirculación mesentérica de rata Sprague-Dawley, mediante microscopía intravital. Tras 18 h desde la inyección intraperitoneal de D-glucosa (40 mg/kg) no se observó ninguna alteración en los parámetros estudiados; tampoco modificó la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 analizadas mediante inmunohistoquímica. Sin embargo, la inyección de IL-1 $\beta$  (200 ng/kg) incrementó el número de leucocitos en fase de rodamiento, adheridos y migrados, mientras que disminuyó la velocidad de rodamiento. Igualmente, se observó un aumento en la expresión de las CAMs. Muy interesantemente, todos estos parámetros proinflamatorios fueron exacerbados cuando se coadministró D-glucosa e IL-1 $\beta$ .

Estos resultados indican que aunque la elevación extracelular de D-glucosa *per se* no causa inflamación en células endoteliales, pero sí desempeña un papel modulador en la inflamación vascular intensificando la acción de otros estímulos inflamatorios. Por todo ello, proponemos que la hiperglucemia no es suficiente para causar directamente un efecto inflamatorio, pero puede exagerar los efectos de una respuesta inflamatoria en curso. Este trabajo sugiere que las aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la vasculopatía diabética deberían disminuir no sólo los niveles de glucosa plasmática, sino también reducir el ambiente proinflamatorio vascular presente.

## ***Summary***

Diabetic vasculopathy is the main cause leading to morbidity and mortality in diabetic patients. Endothelial dysfunction is on the basis of such vascular complications. The hyperglycaemia characteristic in diabetes seems to have important roles in the pathogenesis of vascular complications. However, the mechanisms by what hyperglycaemia mediates vascular damage are not well understood. Diabetes mellitus is now considered as a chronic low-grade inflammatory disease, with augmented circulating levels of different inflammatory markers. Leukocyte adhesion to and transmigration through endothelial cells, which require the expression of endothelial cell adhesion molecules (CAMs), represent key inflammatory events in the onset of atherosclerosis, a condition that is on the basis of different vascular diabetic complications.

The main aim of this work was to elucidate whether enhanced levels of D-glucose could promote accelerated pro-atherosclerotic events through a direct pro-inflammatory effect on endothelial cells. *In vitro* assays indicated that the mere elevation of extracellular D-glucose from 5.5 to 22 mM for 18 h did not enhance intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) or vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression, quantified by flow cytometry, in cultured human endothelial cells (HUVEC). The pro-inflammatory cytokine interleukin (IL)-1 $\beta$  (0.1 to 10 ng/ml) increased CAMs induction in a concentration-dependent manner. Surprisingly, ICAM-1 and VCAM-1 expression induced by IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) was exacerbated in a medium containing 22 mM D-glucose. These effects were not due to osmolarity changes in the culture medium, as L-glucose did not mimic D-glucose effects. Analogously, high D-glucose did not modify the adhesion of HL-60 leukocytes to HUVEC monolayer *in vitro*, but increased the adhesion previously elicited by IL-1 $\beta$ , as measured by flow chamber assays. We explored other inflammatory markers, such as the nuclear transcription factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and the extracellular regulated kinase 1/2 (ERK 1/2). While a high D-glucose medium alone did not activate any of these factors, it clearly exacerbated the NF- $\kappa$ B and ERK 1/2 activation induced by IL-1 $\beta$ . ERK 1/2 and NF- $\kappa$ B were involved in the expression of VCAM-1 elicited by IL-1 $\beta$ , while ICAM-1 expression was not mediated by these molecules. In addition to inflammatory markers, IL-1 $\beta$  increased GLUT-1 expression, determined by Western blot and flow cytometry. High D-glucose did not modify GLUT-1 levels but increased GLUT-1 induction by IL-1 $\beta$ .

In order to investigate the interactions between high D-glucose and IL-1 $\beta$  in a more complex *in vivo* model, leukocyte trafficking was evaluated in the Sprague-Dawley rat mesenteric microcirculation by intravital microscopy. After 18 h of an intraperitoneal injection of D-glucose alone (40 mg/kg) no alterations of the trafficking parameters were observed; accordingly, no changes in ICAM-1 or VCAM-1 expression were observed by immunohistochemistry. However, the parallel injection of IL-1 $\beta$  (200 ng/kg) increased venular leukocyte rolling flux, adhesion, and transmigration, while decreasing rolling velocity. Enhanced CAMs expression was also observed. More interestingly, all these pro-inflammatory parameters were exacerbated when D-glucose and IL-1 $\beta$  were co-administered.

These results indicate that although high D-glucose *per se* does not cause inflammation in endothelial cells, it does play a modulatory role in vascular inflammation by exacerbating other pro-inflammatory stimuli. We therefore propose that diabetic hyperglycemia is not sufficient to directly cause vascular inflammation but can exaggerate the effects of an ongoing inflammatory response. We suggest that the therapeutic approaches for diabetic vasculopathy should aim to lower not only the levels of plasmatic glucose but also to reduce the pro-inflammatory vascular environment.

## *Abreviaturas*

[H<sup>3</sup>]2-DOG: 2-deoxiglucosa tritiada  
 [γ-<sup>32</sup>P]ATP: adenosín trifosfato-[γ-<sup>32</sup>P]  
 2-DOG: 2-deoxiglucosa  
 ADN: ácido desoxiribonucleico  
 AGEs: productos finales de glicosilación avanzada  
 Ang-II angiotensina II  
 ANOVA: análisis de la varianza  
 AP-1: proteína activadora 1  
 ARNm: ácido ribonucleico mensajero  
 ATCC: American Type Culture Collection  
 BBS: solución tampón bicarbonatada  
 BCA: colorimétrico del ácido bicinconínico  
 BH<sub>4</sub>: tetrahidrobiopterina  
 BMK1: gran quinasa 1 (también denominada ERK 5)  
 BSA: albúmina de suero bovino  
 CAMs: moléculas de adhesión  
 COX-2: ciclooxigenasa-2  
 CRP: proteína C-reactiva  
 DAG: diacilglicerol  
 DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol 2HCl  
 DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco  
 DTT: ditioneitol  
 D<sub>v</sub>: diámetro vascular  
 E.E.M.: error estándar de la media  
 ECGS: suplemento de crecimiento de células endoteliales  
 ECL: electro-quimioluminiscencia por luminol  
 EDTA: ácido etilendiamina-tetraacético  
 ELAM-1: molécula de adhesión de células endoteliales-leucocitos-1 (E-selectina)  
 EMSA: ensayo de retardo en gel o *electromobility shift assay*  
 eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial  
 ERK 1/2: quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2  
 ET-1: endotelina-1  
 FAD: flavin adenin dinucleótido  
 FCS: suero fetal de ternera  
 FMN: flavin mononucleótido  
 GLUT: transportador de glucosa



GMP-140: proteína granular de membrana 140 (P-selectina)  
GMPc: guanosín monofosfato cíclico  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno  
HL-60: línea celular de leucocitos de leucemia promielocítica humana (*Human promyelocytic leukemia cells*)  
HRP: peroxidasa de rábano  
HSA: albúmina de suero humano  
HUVEC: células endoteliales de vena de cordón umbilical humano  
ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1  
IKK: quinasas de IκB  
IL: interluquina  
IL-1β: interleuquina-1 β  
IL-1R1: receptor tipo I de interleuquina-1 β  
INCAM-110: molécula de adhesión celular inducible (también conocida como VCAM-1)  
INF-γ: interferón γ  
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible  
IκB: proteína inhibidora de NF-κB  
JNK: quinasa NH<sub>2</sub>-terminal de c-Jun  
LDL: lipoproteína de baja densidad  
LFA-1: antígeno de la función leucocitaria-1  
LPS: lipopolisacárido bacteriano  
MAdCAM-1: molécula de adhesión celular adresina de la mucosa-1  
MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos  
MAPKK o MKK: proteína MAPK quinasa  
MAPKKK o MAP3K: proteína MAPK quinasa quinasa  
MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1  
MEK 1/2: MAPK quinasa de ERK 1/2  
NADPH: dinucleótido de nicotiamida-adenina fosfato  
NF-κB: factor de transcripción nuclear κB  
NIK: quinasa inductora de NF-κB  
NO: óxido nítrico  
NOS: sintasa de óxido nítrico  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: aniones superóxido  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
ONOO•: peroxinitrito  
PAM: presión arterial media

PBS: solución salina tamponada con fosfato  
PDTC: ditiocarbamato de pirrolidina  
PECAM: molécula de adhesión de células endoteliales-plaquetas  
PKC: proteína quinasa C  
PMN: leucocitos polimorfonucleares  
PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro  
ROS: especies reactivas de oxígeno  
SAPK proteína quinasa activada por estrés (también conocida como JNK)  
SD: ratas Sprague-Dawley  
SDS: dodecilsulfato sódico  
SDS-PAGE: geles de electroforesis de SDS-poliacrilamida  
sGC: guanilato ciclasa soluble  
TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante- $\beta$   
TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
TRAF6: factor 6 asociado al receptor de TNF  
TXA<sub>2</sub>: Tromboxano A<sub>2</sub>  
VCAM-1: molécula de adhesión de células vasculares-1  
VEGF: factor de crecimiento de células endoteliales vasculares  
VLA: antígeno muy tardío o *very late antigen*  
V<sub>mean</sub>: flujo sanguíneo venular  
V<sub>rbc</sub>: velocidad de glóbulos rojo

## ***Introducción***

## **DIABETES MELLITUS**

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por niveles persistentes elevados de glucosa en sangre como consecuencia de una alteración de la secreción y/o acción de la insulina, que también afecta al metabolismo del resto de hidratos de carbono, lípidos y proteínas.

La diabetes puede ser de varios tipos, siendo la diabetes tipo 1 y tipo 2 las más frecuentes entre la población. La diabetes tipo 1 o insulina-dependiente tiene su base en una secreción de insulina deficiente o nula a causa de la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas como consecuencia de un proceso autoinmune, siendo necesaria la administración de insulina. Representa el 5 - 10 % de los pacientes diabéticos. La diabetes tipo 2 o insulina-independiente se debe principalmente a una resistencia por parte de los tejidos a la acción de la insulina. Es el tipo más frecuente de diabetes, representando entre un 90 - 95 % de los pacientes diabéticos, y su aparición suele ser a partir de los 40 años de edad, asociada generalmente con otros desórdenes metabólicos como la obesidad, la dislipidemia o la hipercolesterolemia. Aproximadamente un 50 % de los casos permanecen sin diagnosticar.

### ***Prevalencia de la diabetes***

Mientras que en el año 1995 se calculó que más de 135 millones de personas en todo el mundo (un 4 % de la población total) eran diabéticos, en 2030 se estima que esta prevalencia aumentará hasta alcanzar la cifra de 366 millones de personas con diabetes (un 5,4 % de la población mundial) (King y col., 1998; Wild y col., 2004).

Mientras que la prevalencia de la diabetes mellitus tipo 1 (aproximadamente un 0,2 % de la población total) apenas se verá incrementada en este período de tiempo, sí que existe una tendencia progresiva del aumento de la incidencia de la diabetes mellitus tipo 2,

debido fundamentalmente al crecimiento de la población, a un aumento de la esperanza de vida en los países socio-económicamente más desarrollados y al actual estilo de vida marcado por el cambio en los hábitos alimenticios, la obesidad y el sedentarismo. Todos estos datos han llevado a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a calificar la diabetes mellitus como la primera enfermedad epidémica de carácter no infeccioso.

El aumento de la prevalencia de esta enfermedad se producirá principalmente en los países en vías de desarrollo, sobre todo en áreas urbanas. Mientras que en los países desarrollados el mayor número de personas con diabetes son mayores de 65 años, es en los países en vías de desarrollo donde aumenta la población diabética con edad comprendida entre 45 y 65 años.

En España se estima que entre un 6 y un 10% de la población es diabética, lo que supone que alrededor de 2,1 millones de españoles son diabéticos (Abadal y col., 2000), siendo la diabetes la tercera causa de mortalidad entre las mujeres y la séptima entre los varones (Bosch y col., 2002).

Los principales factores de riesgo que pueden dar lugar a la aparición de la diabetes tipo 2 son la edad, una baja actividad física, el aumento del consumo de alcohol y tabaquismo y la obesidad, cuya prevalencia también aumenta entre la población.

## **COMPLICACIONES VASCULARES ASOCIADAS A DIABETES**

La diabetes mellitus es una de las enfermedades con mayor impacto sociosanitario, no sólo por su elevada frecuencia sino por las complicaciones crónicas que comporta esta enfermedad (Bosch y col., 2002). Las enfermedades vasculares, en particular la aterosclerosis, son la principal causa de discapacidad y mortalidad en pacientes diabéticos, llegando a suponer hasta un 80 % de las muertes entre los pacientes con diabetes mellitus

tipo 2 (Ruderman y Haudenschild, 1984; Haffner SM, 1998). La diabetes mellitus incrementa el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria, accidentes cerebrovasculares y enfermedad arterial periférica. En comparación con el resto de la población, los pacientes diabéticos tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardio y cerebrovasculares, siendo la mortalidad por enfermedad cardiovascular 7,5 veces mayor entre pacientes diabéticos que en no diabéticos. (Sowers y col., 2001). Debido a que estas enfermedades vasculares aparecen con mayor frecuencia entre pacientes diabéticos que en el resto de la población sana, se acuñó el término de vasculopatía diabética para referirse al conjunto de complicaciones vasculares asociadas a la diabetes y la *American Heart Association* ha declarado la diabetes como uno de los principales factores de riesgo cardiovascular (Grundy y col., 1999).

Estas complicaciones pueden afectar a vasos de pequeño, mediano o gran tamaño dando lugar a micro y macroangiopatía respectivamente. Ejemplos de microangiopatía son la nefropatía (afectación de los vasos renales), la retinopatía (de los vasos de la retina) y la neuropatía (afectación de los nervios periféricos) diabética, mientras que la macroangiopatía diabética se caracteriza por la aparición de aterosclerosis, que afecta principalmente a vasos de mediano y gran calibre. Estas complicaciones que suelen acompañar a la diabetes mellitus varían según el tipo de diabetes, el tiempo de evolución y el grado de control metabólico.

El mecanismo por el cual la diabetes predispone a la vasculopatía diabética no ha sido aún esclarecido. En pacientes con diabetes tipo 2 se ha visto una asociación entre el grado de hiperglucemia y un incremento en el riesgo de padecer complicaciones micro, y macrovasculares (Stratton y col., 2000). Otros factores de riesgo en estos pacientes son la obesidad, la aterosclerosis, la dislipemia, la microalbuminuria, la aparición de disfunción

endotelial, una mayor hiperagregabilidad plaquetaria y la presencia de anormalidades en el proceso de coagulación (Sowers y col., 2001).

Ya que la prevalencia de la diabetes en la población general aumenta drásticamente, se hace necesario entender los mecanismos por los cuales se desarrollan complicaciones vasculares con más frecuencia entre los pacientes diabéticos.

## **DISFUNCIÓN ENDOTELIAL**

El endotelio vascular es una monocapa de células que recubren el interior de los vasos sanguíneos formando una barrera entre la sangre y el resto de tejidos. Lejos de ser una mera separación física, se trata de un tejido especializado capaz de sintetizar diversas sustancias biológicamente activas que son liberadas para mantener la homeostasis vascular, permitir la distribución de nutrientes y asegurar un correcto flujo sanguíneo, mientras que evita la agregación de plaquetas y la formación de trombos. El endotelio es responsable del mantenimiento del tono vascular mediante la liberación de diferentes agentes vasoactivos, bien de carácter constrictor, como el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), la endotelina-1 (ET-1) o la angiotensina II (Ang-II) (Buzzard y col., 1993; Yanagisawa y col., 1988; Manabe y col., 1989) o bien de carácter dilatador, entre los que destaca principalmente el óxido nítrico (NO) (Ignarro y col., 1987; Moncada y col., 1988). El NO es sintetizado por las sintasas de óxido nítrico (NOS), que utilizan L-arginina y oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) como sustrato, y dan lugar a la formación de L-citrulina y NO (Palmer y col., 1988). En el endotelio vascular, el NO es sintetizado constitutivamente por la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS o NOS III). La vida media del NO es muy breve (entre 3 y 10 segundos) por lo que una vez formado difunde rápidamente hacia el músculo liso vascular subyacente donde estimula la actividad de la guanilato ciclasa soluble (sGC) provocando la relajación del

músculo liso, y por tanto del vaso, a través del aumento de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) (Ignarro y col., 1987; Moncada y col., 1988; Murad, 1986). Además de ser un potente vasodilatador, el NO desempeña un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis vascular (Ignarro y col., 1987). El NO es capaz de inhibir la agregación plaquetaria (Radomski y col., 1987), la proliferación del músculo liso vascular (Garg y Hassid, 1989) y la adhesión leucocitaria a la pared del vaso (Kubes y col., 1991).

El marcador más temprano y común entre las enfermedades cardiovasculares, incluyendo la vasculopatía diabética, es la disfunción endotelial. Dicha disfunción se debe a la alteración funcional y/o estructural del endotelio vascular dando lugar al deterioro de las respuestas vasodilatadores dependientes de endotelio, debida principalmente a un desbalance entre las sustancias vasodilatadoras (principalmente una reducida biodisponibilidad de NO) y las sustancias vasoconstrictoras (mayor síntesis de prostanoïdes vasoconstrictores y ET-1) (Hopfner y Gopalakrishnan, 1999).

Tanto en modelos animales (Durante y col., 1988; Oyama y col., 1986) como en pacientes diabéticos (Johnstone y col., 1993; Williams y col., 1996) se ha observado un empeoramiento de la función endotelial que favorece el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Esta disfunción endotelial también se caracteriza por un aumento de marcadores de inflamación, que se acompaña de un mayor depósito de proteínas extracelulares y un engrosamiento de la íntima (Rumble y col., 1997; Schofield y col., 2002). Se han propuestos varios mecanismos para explicar la deficiente vasodilatación dependiente de endotelio descrita en pacientes diabéticos. Entre ellas se encuentra la disminución de NO por una menor síntesis de NO en el endotelio, bien por una expresión disminuida de la eNOS (Wilcox y col., 1997), o por una disminución de los niveles del sustrato, L-arginina (Palmer y col., 1988), o de los cofactores de la eNOS, como el flavin adenin dinucleótido (FAD), el flavin mononucleótido (FMN) y sobre todo la



tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (Vásquez-Vivar y col., 1998). Asimismo, se ha descrito una inactivación acelerada del NO por especies reactivas de oxígeno (ROS), en particular por aniones superóxido (O<sup>•-</sup>) que al combinarse con el NO da lugar a la formación de peroxinitrito (ONOO<sup>•</sup>) (Li y Shah, 2004), especie muy reactiva cuya presencia ha sido descrita en enfermedades vasculares como la aterosclerosis, la diabetes y la hipertensión (Li y Shah, 2004; Touyz y Schiffrin, 2004; Spitaler y Graier, 2002). También puede haber un aumento en la síntesis de prostanoides vasoconstrictores que contrarresten el efecto vasodilatador del NO (Hopfner y Gopalakrishnan, 1999). Por último, se ha propuesto que la falta de respuesta vasodilatadora no es exclusivamente debida a la disfunción endotelial ya que puede aparecer una respuesta anormal a nivel del músculo liso vascular. En pacientes con diabetes tipo 2, las respuestas vasodilatadoras en respuesta a donadores de NO exógenos fueron deficientes, apuntando la posible implicación de una disfunción del músculo liso vascular (Williams y col., 1996).

## **DIABETES COMO ENFERMEDAD INFLAMATORIA**

En los últimos años han aparecido numerosas evidencias que relacionan la diabetes con el establecimiento de un estado inflamatorio crónico, por lo que la diabetes, al igual que la aterosclerosis, se considera actualmente como una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado (Aras y col., 2005). Desde entonces, numerosos estudios han demostrado un aumento de los niveles de diferentes marcadores de inflamación tanto en modelos animales de diabetes (El-Seweidy y col., 2002), como en pacientes diabéticos tipo 1 y 2 (Pickup y col., 2000; Erbagci y col., 2001; Moriwaki y col., 2003).

Entre los marcadores de respuesta de fase aguda que están elevados en pacientes diabéticos tipo 2 y que acompañan a la disfunción endotelial, se incluyen el ácido siálico

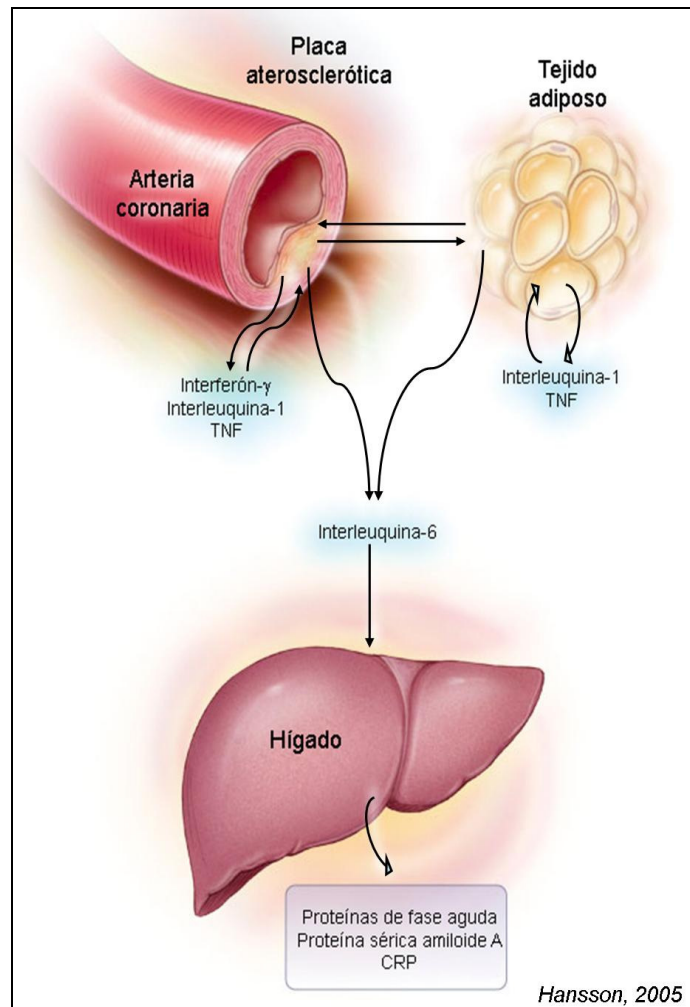
sérico (Crook y col., 1993), la glicoproteína ácida  $\alpha$ -1, la proteína C-reactiva (CRP), la proteína amiloide A sérica, el fibrinógeno y el cortisol (Myrup y col., 1996; Grau y col., 1996; Arnalich y col., 2000). También se han encontrado elevados los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la interleuquina 6 (IL-6), la interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y la interleuquina 18 (IL-18) (Pickup y col. 2000; Kado y col., 1999; Erbagci y col., 2001). Estas citoquinas van a activar, mediante la unión a sus respectivos receptores de membrana, distintas cascadas de señalización intracelulares entre las que se incluyen las tres grandes vías de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), como son p38 MAPK, las quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK 1/2) o la quinasa N-terminal de c-jun (JNK) (Kyriakis y Avruch, 2001; Raingeaud y col., 1995). Igualmente se ha descrito una mayor actividad de factores de transcripción génica implicados en procesos inflamatorios, tales como el factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) o la proteína activadora-1 (AP-1) tanto en animales diabéticos (Nishio y col., 1998) como en pacientes diabéticos (Bierhaus y col., 2001), así como un aumento en los niveles de enzimas que juegan un papel muy importante en el proceso inflamatorio como son la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS o NOS II) (Veelken y col., 2000) o la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Cosentino y col., 2003). En este ambiente inflamatorio, la disfunción endotelial se acompaña de un aumento en la expresión de moléculas de adhesión (CAMs) como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1) y por tanto una mayor adhesión y migración de leucocitos (Cipollone y col., 2005). Este aumento de las CAMs ha sido observado tanto en el sistema cardiovascular de modelos de animales diabéticos (Tschope y col., 2005; Gao y col., 2006) como en pacientes diabéticos en los que se ha descrito un aumento en los niveles circulantes de las formas solubles de ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina (Kado y Nagata,

1999; Fogelstrand y col., 2004; Otsuki y col., 1997). Estas formas solubles de las moléculas de adhesión son considerados como marcadores de las complicaciones micro y macrovasculares y se relacionan con un aumento de la mortalidad por eventos cardiovasculares (Fasching y col., 1996; Jager y col., 2000; Soedamah-Muthu y col., 2006).

A causa de la elevación de estos mediadores inflamatorios, la diabetes mellitus está acompañada de una activación y mayor adhesividad al endotelio de leucocitos polimorfonucleares (PMN) (Shurtz-Swirski y col., 2001; Wierusz-Wysocka y col., 1987) y mononucleares (Cipollone y col., 2005), con una mayor actividad aterogénica y capaces de liberar especies reactivas de oxígeno, IL-1 $\beta$  y otros mediadores proteolíticos que dan lugar a la degradación de tejidos, contribuyendo al aumento del estrés oxidativo, con la subsiguiente inflamación y daño endotelial (Devaraj y Jialal, 2000). El reclutamiento excesivo de leucocitos a menudo conlleva la pérdida de funcionalidad de la célula endotelial lo que contribuye al establecimiento y perpetuación del estado inflamatorio, y se relaciona con algunos de los factores de riesgo cardiovascular (Smedly y col., 1986).

Los pacientes diabéticos tipo 2 están expuestos a este aumento del estrés oxidativo y al estado inflamatorio crónico, antes incluso de cualquier manifestación de angiopatía (Shurtz-Swirski y col., 2001). En los últimos años, cada vez más autores apuntan que el estado inflamatorio precede a la aparición de resistencia insulínica, y por tanto a las manifestaciones clínicas de la diabetes mellitus tipo 2. En esta dirección, cada vez hay más evidencias de que un aumento del tejido graso, especialmente del tejido graso visceral, da lugar a una mayor liberación de mediadores inflamatorios, como ciertas citoquinas (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) (Mohamed-Ali y col., 1997; Hotamisligil y col., 1995), adipoquinas como la resistina y la visfatina (McTernan y col., 2002; Guzik y col., 2006), y quimiocinas como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) (Chacón y col., 2007). Los niveles

plasmáticos de algunas de estas adipoquinas como la visfatina (Chen y col., 2006) o el MCP-1 (Chacón y col., 2006) se han encontrado elevadas en pacientes diabéticos. Estas adipoquinas pueden incluso regular la expresión de las moléculas de adhesión (Ouchi y col., 1999).



**Figura 1: Fuentes de liberación de citoquinas y otros agentes inflamatorios.** Las citoquinas liberadas por los leucocitos y endotelio de las lesiones ateroscleróticas así como por el tejido adiposo dan lugar una mayor síntesis de proteínas de fase aguda, especialmente en el hígado, perpetuando un ambiente inflamatorio.

Todos estos marcadores inflamatorios no son sólo factores de riesgo que predisponen al desarrollo de diabetes, sino que desempeñan un papel importante en el

desarrollo y establecimiento de enfermedades vasculares asociadas a la diabetes, como la aterosclerosis y las complicaciones renales (Moriwaki y col., 2003; Soedamah-Muthu y col., 2006; Guzik y col., 2006).

### **TRANSPORTADOR DE GLUCOSA-1 (GLUT-1)**

El transporte de glucosa al interior celular está mediado por dos grupos de transportadores estructural y funcionalmente distintos: los cotransportadores de glucosa dependientes de sodio (SGLT) (Wright, 2001) y los transportadores facilitadores de glucosa independientes de sodio (GLUT) (Mueckler, 1985; Joost y Thorens, 2001). Los transportadores GLUT son una serie de glicoproteínas de membrana, de entre 45-60 kDa, pertenecientes a la familia de transportadores GLUT (Mueckler y col., 1985). Este transporte de glucosa consiste en un proceso de difusión facilitada que no requiere el gasto de energía por parte de la célula, estereoespecífico y saturable (Jones y Nickson, 1981). Hasta el momento se han identificado trece miembros de esta familia en mamíferos (Wood y Trayhurn, 2003), aunque algunos de ellos se han descartado por ser pseudogenes y no todos son transportadores de glucosa, sino que pueden transportar fructosa (GLUT-5) o mioinositol (HMIT1) (Joost y Thorens, 2001). Estos transportadores se expresan específicamente en diferentes tipos de células o de tejidos y presentan diferentes cinéticas y sistemas de regulación reflejando una funcionalidad específica.

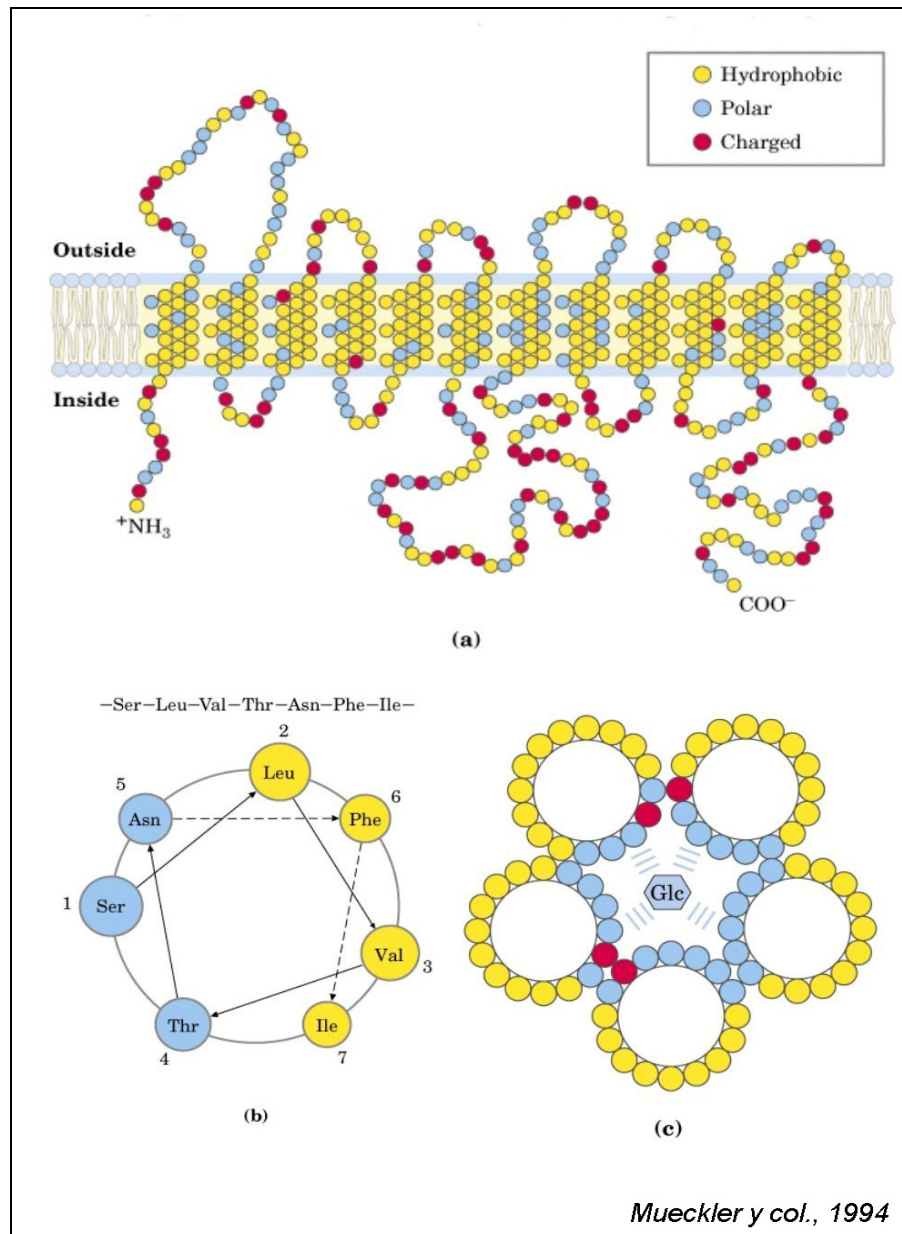
GLUT-1 fue el primer transportador de glucosa purificado (Kasahara y Hinkle, 1977) y clonado (Mueckler y col., 1985) de la membrana de eritrocitos humanos. Se trata de un transportador que puede presentar diferentes grados de glicosilación, altamente hidrofóbico que presenta 12 dominios transmembrana en  $\alpha$ -hélice, de las cuales, al menos cinco, se juntan en la membrana para formar un compartimento acuoso por el cual la

glucosa y otros azúcares pueden atravesar la bicapa lipídica (Mueckler y col., 1985). Se trata de un transportador de alta afinidad ( $K_m = 0,5-3,7 \text{ mM}$ ) pero baja capacidad, que bajo concentraciones fisiológicas de glucosa, actúa casi a la velocidad máxima de transporte (Mueckler, 1994; Mann y col., 2003).

GLUT-1 es una isoforma que se expresa constitutivamente en multitud de células que desempeña un papel crucial en proporcionar y mantener los requerimientos basales de glucosa (Mann y col., 2003). GLUT-1 se expresa en células endoteliales y células de músculo liso vascular, siendo el transportador predominante en el endotelio vascular (Takata y col., 1990; Mann, 2003). También se han encontrado altos niveles de expresión de GLUT-1 en células epiteliales (Takata y col., 1990) y su coexistencia con la isoforma GLUT-4 en tejidos sensibles a insulina, como el tejido adiposo o el músculo esquelético, donde proporciona bajos niveles de glucosa necesarios para la actividad celular en reposo (Zorzano y col., 1989; Marette y col., 1992).

Aunque GLUT-1 se expresa de manera constitutiva, su expresión puede ser modificada por diversos estímulos. De esta manera, los niveles de GLUT-1 pueden ser inducidos por diferentes factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento de fibroblastos o el factor de estimulación de colonias de macrófagos granulocitos (Hiraki y col., 1988; Maraldi y col., 2006), por ésteres de forbol (Hiraki y col., 1988; Shikhman y col., 2001), por ET-1 (Fong y col., 2001), y por diferentes citoquinas como el  $\text{TNF-}\alpha$  (Stephens y col., 1992; Shikhman y col., 2001) o  $\text{IL-1}\beta$  (Bird y col., 1990; Shikhman y col., 2001). El aumento de transportadores GLUT-1 puede deberse a una translocación hacia la membrana plasmática de vesículas donde se almacenan transportadores preexistentes, a una mayor estabilización del ARNm o a una estimulación de expresión génica que da lugar a una mayor síntesis de nuevos transportadores. La glucosa es también un estímulo capaz de modular la expresión de

GLUT-1 en la membrana celular, cuya concentración en el medio modifica inversamente los niveles de proteína y de ARNm de GLUT-1 (Walker y col., 1988; Tordjman y col., 1990; Wertheimer y col., 1991).



**Figura 2: Estructura hipotética del transportador de glucosa GLUT-1.** (A) Topología de las 12 hélices transmembrana de GLUT-1. (B) Organización de los aminoácidos de cada cadena formando una estructura hidrofílica (azul) que dará lugar a la parte interna del canal y otra hidrofóbica (amarillo) en contacto con la membrana plasmática. (C) Poro acuoso formado por el agrupamiento de al menos 5 hélices transmembrana.

## **ATEROSCLEROSIS**

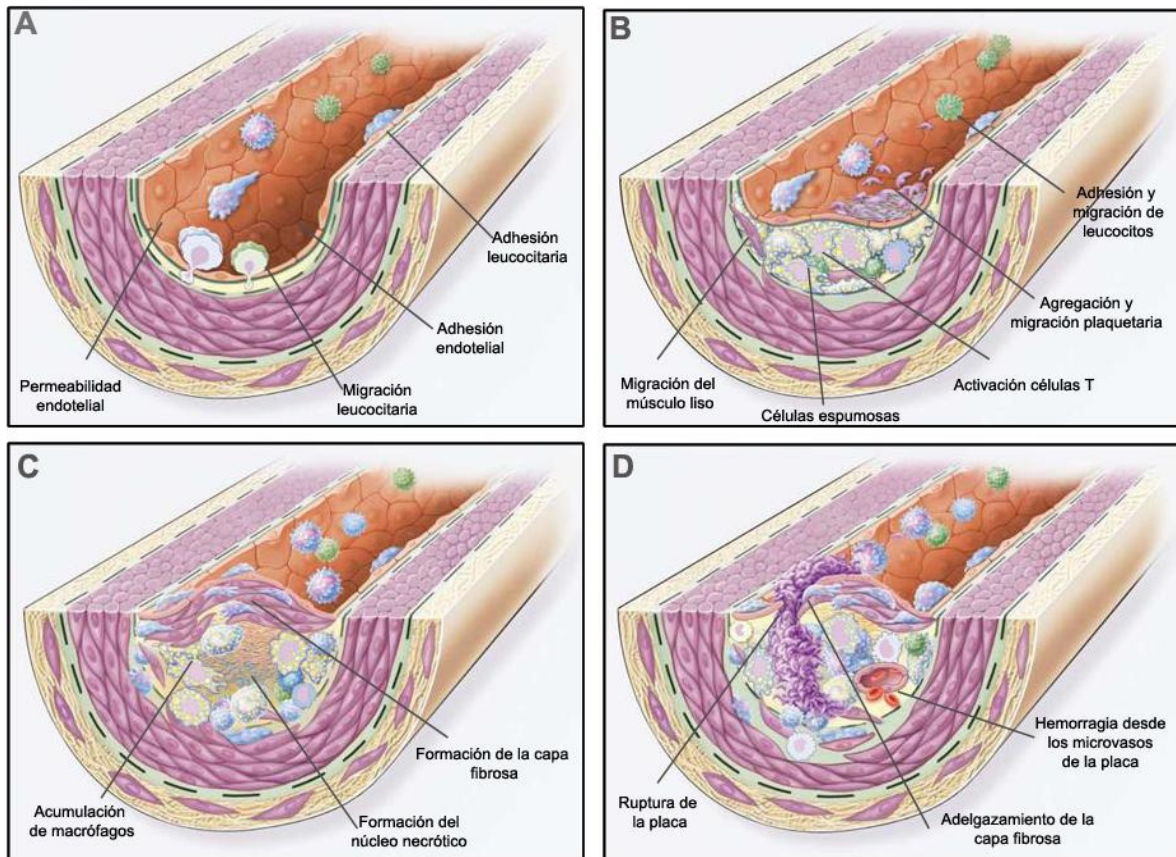
El proceso de aterogénesis ha sido considerado durante mucho tiempo como la simple acumulación de lípidos en la pared vascular, ya que los niveles plasmáticos elevados de colesterol, especialmente de lipoproteínas de baja densidad (LDL), son uno de los principales factores de riesgo en el desarrollo de aterosclerosis (National Cholesterol Education Program). Sin embargo, el proceso aterogénico es una respuesta, a nivel molecular y celular, de carácter inflamatorio inducida por la acumulación de lípidos (Ross, 1993).

Las lesiones se forman por una respuesta inflamatoria y fibroproliferativa exagerada ante varias formas de daño en el endotelio y el músculo liso de la pared arterial. Así, un gran número de factores de crecimiento, citoquinas y moléculas vasoregulatoras participan en este proceso (Ross, 1993).

La disfunción endotelial da lugar a una alteración de la homeostasis del endotelio, permitiendo una mayor permeabilidad y una mayor adhesión de plaquetas y leucocitos a la capa endotelial. Esta respuesta inflamatoria estimula la proliferación y migración de las células musculares lisas de la capa media a la íntima, dando lugar a un engrosamiento de la pared vascular (Rumble y col., 1997; Schofield y col., 2002). Al mismo tiempo, aumenta el reclutamiento e infiltración de macrófagos y de linfocitos T (Jonasson y col., 1986; van der Wal y col., 1992) que tras su activación liberan enzimas hidrolíticas, citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento, incrementando el estado inflamatorio ya presente (Libby y col., 1996; Tipping y Hancock, 1993). La acumulación concomitante de células mononucleares, la migración y proliferación de células del músculo liso vascular y la formación de tejido fibroso da lugar a la progresión y restructuración de las lesiones ateroscleróticas. Al mismo tiempo, los monocitos infiltrados son capaces de acumular en su interior moléculas de LDL oxidadas, convirtiéndose en células espumosas (Libby y col.,



1996). En este punto la luz del vaso está considerablemente disminuida y los mecanismos de dilatación vascular no son suficientes para compensar la alteración del flujo provocada.



**Ross, 1999**

**Figura 3: Formación de la placa aterosclerótica.** Existen diferentes fuentes de estímulos inflamatorios que dan lugar a la disfunción endotelial. La activación del endotelio promueve un mayor reclutamiento de leucocitos, los cuales migran a través de la capa endotelial y se establecen en la capa íntima del vaso. Los monocitos activados se convierten en células espumosas tras la acumulación de lípidos, mientras que las células de músculo liso de la capa adventicia migran y proliferan hacia la capa íntima. Estas células son capaces de sintetizar proteínas de la matriz de manera exagerada y diferentes agentes inflamatorios como citoquinas dando lugar a la formación de la capa fibrosa y al perpetuamiento de un ambiente inflamatorio, favoreciendo la progresión de las lesiones ateroscleróticas.

Como se ha mencionado, la aterosclerosis también es considerada como una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado (Ross, 1993). En 1990, Barath y col. demostraron la presencia de TNF- $\alpha$  en las células de músculo liso y macrófagos de las placas mientras que Moyer y col. (1991) observaron la presencia de ARNm de IL-1 con una distribución similar. En estas lesiones se ha detectado la presencia de moléculas de adhesión que facilitan la adhesión de los monocitos al endotelio vascular (van der Wal y col., 1992; Davies y col., 1993; Wood y col., 1993). Así, se ha descrito la presencia de ICAM-1 y VCAM-1 en lesiones ateroscleróticas en arterias humanas (Poston y col., 1992; O'Brien y col., 1993; Wood y col., 1993). Tanto las citoquinas inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 (Tipping y col., 1993), como las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox) (Frostegard y col., 1993), y el aumento de las fuerzas de rozamiento en los vasos pueden incrementar la expresión de dichas moléculas (Nagel y col., 1994; Tsuboi y col., 1995;). El aumento de la expresión de ICAM-1 puede contribuir a la deposición de fibrinógeno y a la adhesión de macrófagos, seguida de la subsiguiente infiltración endotelial (Languino y col., 1993). La adhesión leucocitaria a la pared vascular representa el primer paso para el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (Ross, 1993)

Igualmente, se ha encontrado una mayor activación de NF- $\kappa$ B en el endotelio que recubre las lesiones ateroscleróticas, en las células de músculo liso, tanto en la capa media como en la capa íntima de las lesiones ateroscleróticas, y en macrófagos, apoyando la idea de que el proceso aterogénico es en sí mismo un proceso inflamatorio (Brand y col., 1996).

## **PROCESO DE RODAMIENTO LEUCOCITARIO**

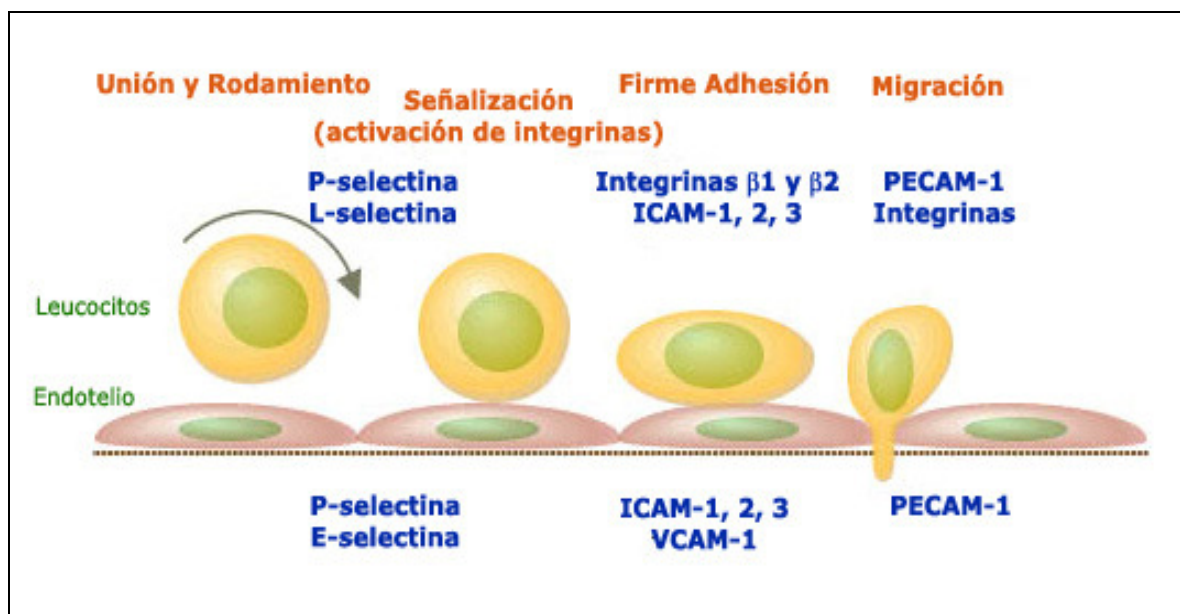
La migración de leucocitos desde la circulación hacia los tejidos es un paso crucial durante la respuesta inmune. Para ello es necesario el reclutamiento de estas células del

sistema inmune por parte del endotelio, siendo un proceso complejo en el que se requiere la interacción de diferentes receptores o ligandos expresados en la superficie endotelial con sus correspondientes receptores en las células del sistema inmune. (Springer, 1994, Bevilacqua y col., 1991, Albelda, 1991, Shimizu y col., 1991).

La migración de las células inmunes es imprescindible para que se desencadene una respuesta de defensa por parte del hospedador ante un daño o infección. Sin embargo, esta respuesta puede volverse potencialmente dañina y contribuye a la etiopatogenia de muchas enfermedades y desórdenes inflamatorios. Tanto en modelos animales de diabetes (Sugimoto y col., 1997) como en pacientes diabéticos (Cipollone y col., 2005; Galkina y Ley, 2006), se ha descrito un aumento en el reclutamiento leucocitario y en la migración de leucocitos por parte del endotelio vascular, lo que parece predisponer a la formación y progresión de lesiones ateroscleróticas.

El proceso de migración leucocitaria implica varias fases con la actuación de un grupo heterogéneo de moléculas de adhesión expresadas tanto en el endotelio vascular como en los leucocitos, siendo este proceso complejo y altamente específico. Al menos tres pasos, con múltiples opciones moleculares, dan lugar a una gran diversidad en las señales (Butcher, 1991). El primer paso en el proceso de reclutamiento leucocitario es la marginación de los leucocitos, cuando éstos abandonan la corriente central de las células sanguíneas e interaccionan con el endotelio a través de selectinas dando lugar al rodamiento de los leucocitos a lo largo de la capa endotelial de los vasos (Cohnheim, 1889). Es en las vénulas postcapilares donde se produce el grueso de la migración leucocitaria pero sólo en estados de inflamación (Fiebig y col., 1991). Este primer contacto es transitorio pero es donde los leucocitos pueden activarse y seguir con el reclutamiento celular, aunque ocasionalmente los leucocitos no llegan a activarse y se liberan del endotelio volviendo al torrente sanguíneo (Lawrence y Springer, 1991). Una vez activos,

los leucocitos establecen una interacción más fuerte con el endotelio permitiendo la migración del leucocito a través de la barrera endotelial hasta llegar a los tejidos subyacentes (Butcher, 1991; Lawrence y Springer, 1991). Esta firme adhesión y diapedesis está mediada por la interacción de integrinas expresadas en la superficie de los leucocitos activos con miembros de la superfamilia génica de las inmunoglobulinas expresadas en el endotelio (Butcher, 1991; Springer, 1994).

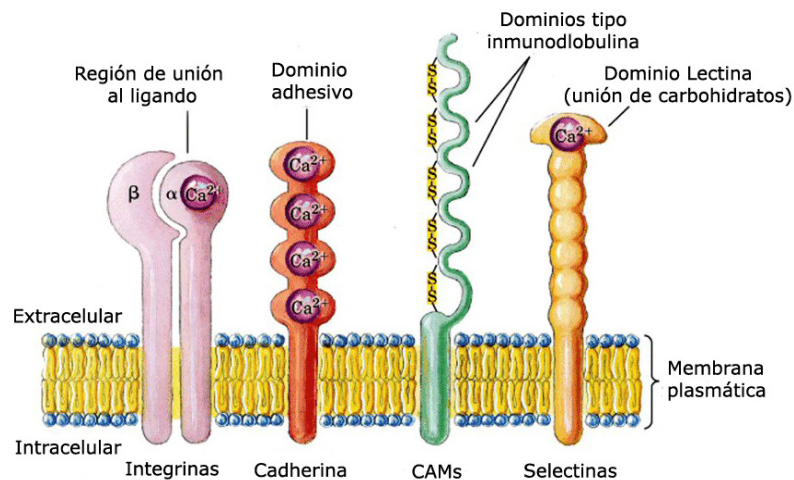


**Figura 4: Esquema del proceso de reclutamiento leucocitario.** Primeramente se establecen interacciones entre las selectinas expresadas en leucocitos y endotelio provocando que los leucocitos rueden lentamente sobre la pared vascular. Esto provoca la activación de las integrinas en los leucocitos que interaccionarán con las proteínas de la familia de las Ig (ICAM-1 y VCAM-1) estableciendo uniones más consistentes hasta que el leucocito quede adherido al endotelio, facilitando su migración al espacio subendotelial.

## MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Las moléculas de adhesión son proteínas de membrana que se expresan en leucocitos, células endoteliales y plaquetas que intervienen en la migración selectiva,

maduración, activación y función efectora de los leucocitos, no sólo bajo condiciones fisiológicas como ocurre en el mantenimiento de la homeostasis, sino también en condiciones patológicas como la inflamación.



**Figura 5: Proteínas que median interacciones célula-célula.** Entre las diferentes proteínas encargadas en establecer interacciones entre células se encuentran las integrinas, que interaccionan con otras células o con la matriz extracelular; las caderinas, que forman uniones homofilicas; las selectinas cuyos ligandos son carbohidratos y las moléculas de adhesión que pertenecen a la superfamilia de las Ig, que establecen uniones homo y heterofilicas.

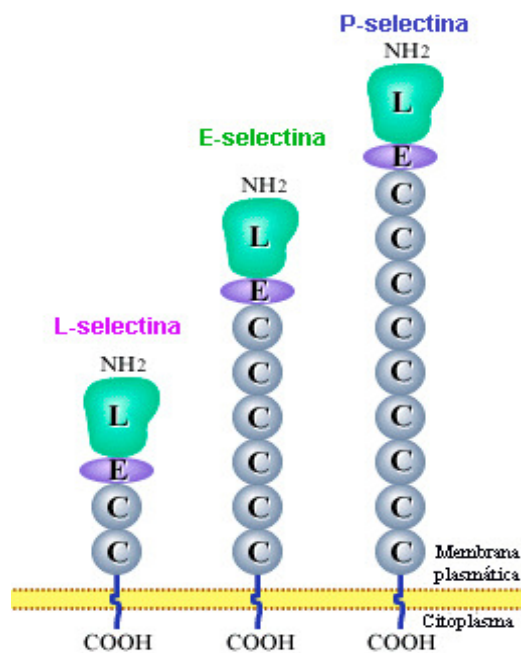
Un requisito imprescindible para su entrada hacia los tejidos es que se den una serie de cambios a nivel molecular en la superficie de las células endoteliales vasculares que indiquen inflamación o daño tisular. La magnitud y duración de la respuesta depende de la naturaleza del estímulo inflamatorio, lo que indica que las moléculas implicadas en este proceso son diferentes o están diferencialmente reguladas (Springer, 1994). En los últimos quince años el uso de anticuerpos específicos ha permitido la identificación de diferentes moléculas de adhesión implicadas en la interacción entre leucocitos y el endotelio vascular dando lugar al reclutamiento, adhesión y migración leucocitaria. Estas moléculas

pertenecen a tres grandes familias: las selectinas, las integrinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas.

### ***Selectinas***

La familia de las selectinas son un grupo de moléculas de adhesión que unen carbohidratos a través de un dominio N-terminal tipo lectina dependiente de  $\text{Ca}^{+}$  (Bevilacqua y col., 1991; Rosen, 1993). Este grupo está formado por tres miembros: L-selectina (Mel-14), P-selectina (GMP-140) y E-selectina (ELAM-1). L-selectina se expresa en todos los leucocitos circulantes (Lasky y col., 1989; Camerini y col., 1989). P-selectina se expresa constitutivamente, pero en respuesta a mediadores de inflamación aguda, tales como la trombina (Sugama y col., 1992), la histamina (Jones y col., 1993), los radicales libres de oxígeno, varios neuropéptidos (Smith y col., 1993), el LPS o citoquinas proinflamatorias como  $\text{TNF-}\alpha$  (Gotsch y col., 1993; Weller y col., 1992), la P-selectina es rápidamente movilizada hacia la membrana celular desde los cuerpos Weibel-Palade de las células endoteliales o desde los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas donde se encuentra almacenada (Johnston y col., 1989). Esta molécula es capaz de unir neutrófilos y monocitos e iniciar la fase más temprana del reclutamiento de leucocitos ante un evento inflamatorio (Lorant y col., 1993; Jones y col., 1993; Geng y col., 1990). E-selectina se expresa únicamente en la superficie de células endoteliales (Weller y col., 1992; Bevilacqua y col., 1989). Está implicada en la adhesión de neutrófilos, monocitos y células T (Bevilacqua y col., 1989; Shimizu y col., 1991). La expresión de E-selectina es inducida por diferentes citoquinas proinflamatorias como IL-1 y  $\text{TNF-}\alpha$  (Weller y col., 1992; Bevilacqua y col., 1989), por neuropéptidos (Smith y col., 1993) así como por lipopolisacárido (LPS) bacteriano (Shimizu y col., 1991; Bevilacqua y col., 1989).

Las selectinas establecen uniones relativamente débiles entre los leucocitos y las células endoteliales de la pared vascular, permitiendo que los leucocitos rueden sobre el endotelio en el mismo sentido del flujo sanguíneo y que establezcan otro tipo de uniones más estables (Lawrence y Springer, 1991; von Andrian y col., 1991).



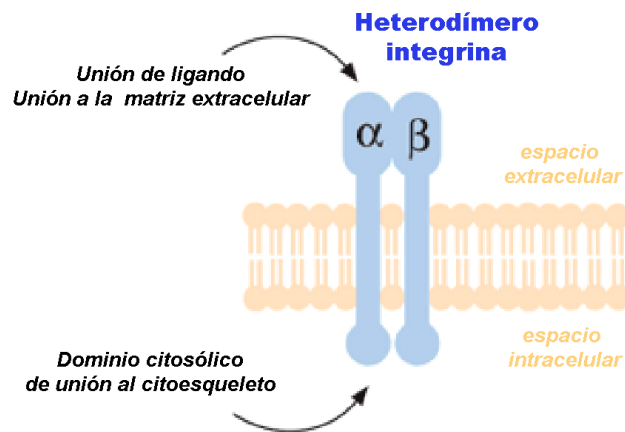
**Figura 6: Estructura de la familia de las selectinas.** En la parte extracelular, las selectinas poseen un dominio lectina tipo C en el extremo amino-terminal (L), seguido de un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) (E) y varios dominios reguladores (C). Además constan de un dominio transmembrana y una cola citoplasmática.

### ***Integrinas***

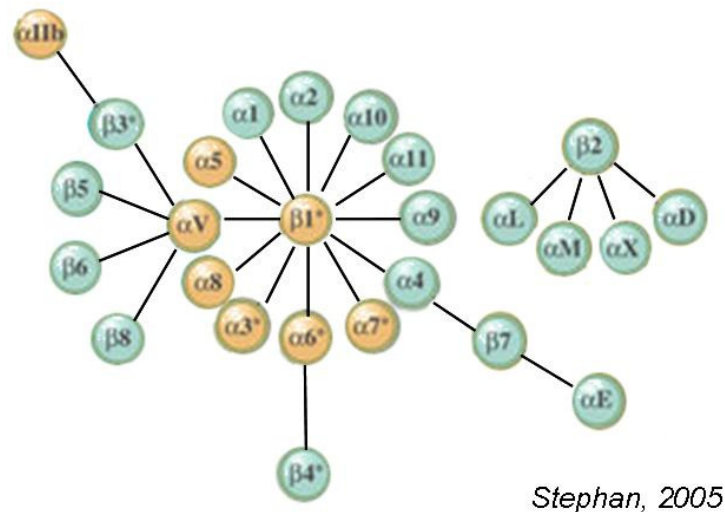
Las integrinas son un grupo de moléculas de adhesión muy versátiles implicadas en gran variedad de procesos biológicos tales como el desarrollo embrionario, la reparación de tejidos, la angiogénesis, la inflamación y la hemostasis. (Springer y Wang, 2004; Hynes,

1992; Albelda y Buck, 1990; Sonnenberg, 1993). Cada integrina es un heterodímero formado por una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$  unidas no covalentemente. Se agrupan en diferentes subfamilias caracterizadas por el tipo de cadena  $\beta$  que contienen. Median interacciones célula-célula y célula-matriz, transmitiendo señales de manera bidireccional a través de la membrana plasmática que da lugar a reorganizaciones estructurales a gran escala y, finalmente, producen la activación de los leucocitos, fenómeno caracterizado por la transición de un estado no adhesivo y de baja afinidad a un estado transitorio de gran afinidad (Hynes, 1992). Las integrinas que intervienen en la interacción leucocito-endotelio pertenecen a las subfamilias  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_7$ . Así, en la subfamilia  $\beta_2$  encontramos a la integrina  $\alpha_L\beta_2$  (también conocida como CD11a/CD18 o antígeno asociado a la función leucocitaria-1 (LFA-1)) presente en la superficie de la mayoría de los leucocitos y que interactúa con el primer dominio Ig de las moléculas de adhesión intercelular (ICAMs) (Stanley y col., 1994). También pertenece a esta familia la integrina  $\alpha_M\beta_2$  (CD11b/CD18 o Mac-1), presente fundamentalmente en macrófagos y granulocitos, asimismo capaz de unirse a ICAM-1 pero no a ICAM-2 o -3, por lo que se considera que Mac-1 es un receptor implicado en el reclutamiento de células mieloides hacia sitios de inflamación (Diamond y col., 1990). Un segundo grupo de integrinas es el formado por una cadena  $\beta_1$  combinadas con diferentes cadenas  $\alpha$ , formando el grupo llamado de antígenos muy tardíos (VLA o *very late antigens*). Así, la integrina  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4 o CD49d/CD29) se expresa en leucocitos y se une a la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1) en células endoteliales, así como a fibronectina (Chan y col., 1992). También la integrina  $\alpha_4\beta_7$  (CD49d/ $\beta_7$ ) es capaz de unirse a VCAM-1, a fibronectina y a la molécula de adhesión celular adresina de la mucosa-1 (MAdCAM-1) (Strauch y col., 1994; Berlin y col., 1993).





**Figura 7: Estructura básica de las integrinas.** Cada integrina está formada por dos glicoproteínas (una subunidad alfa y otra beta) transmembranas que comunican el exterior con el interior celular. La región extracelular puede unirse tanto a ligandos presentes en otras células, a proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina y el colágeno o incluso a factores de crecimiento. El dominio intracelular se encuentra unido al citoesqueleto lo que permite una rápida reorganización de las integrinas en la membrana plasmática y la transducción de señales.

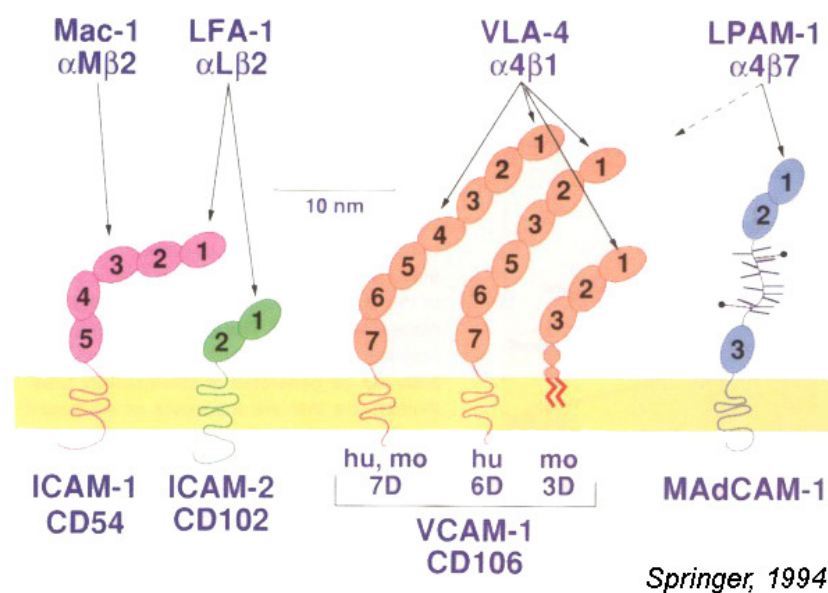


Stephan, 2005

**Figura 8: Miembros de la familia de las integrinas.** Hasta la fecha se conocen 18 subunidades alfa y 8 subunidades beta en humanos. Las integrinas se unen formando heterodímeros entre una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ . Se conocen 24 integrinas diferentes con distinta especificidad al ligando, y diferentes distribución celular y tisular

### Superfamilia de las inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas (Ig) son proteínas que forman una gran superfamilia génica y que son reconocidas por receptores tipo integrina en las células inmunes. A esta superfamilia pertenecen miembros como la moléculas de adhesión intercelular-1, -2 y -3 (ICAM-1, -2 y -3), la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1), la molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas (PECAM) y la molécula de adhesión celular adresina de la mucosa-1 (MAdCAM-1). Las uniones que establecen con sus receptores son más fuertes que aquellas que establecen las selectinas, por lo que dan lugar a una unión más sostenida de los leucocitos al endotelio de la pared vascular que favorece su migración (Butcher, 1991).



**Figura 9: Moléculas de Adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig).** Los distintos miembros de esta familia constan de varios dominios tipo Ig en su región extracelular. Sus principales ligandos son miembros de la familia de las integrinas. MAdCAM-1, además, posee una región tipo mucina.

Molécula de Adhesión Intercelular 1 (ICAM-1)

La molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1 o CD54) es una glicoproteína de 90 kDa que pertenece a la superfamilia génica de las inmunoglobulinas (Printseva y col., 1991). Puede encontrarse diferencialmente glicosilada según el tipo celular donde se exprese, con lo que su peso molecular puede variar entre 80 y 114 kDa. (Dustin y col., 1986)

ICAM-1 se expresa en la superficie de diversos tipos celulares, incluyendo células endoteliales y epiteliales, macrófagos, células tipo fibroblastos y células dendríticas (Dustin y col., 1986). Posee cinco dominios tipo Ig que conforman la región extracelular, una pequeña cola citoplasmática y una región transmembrana (van de Stolpe y van der Saag, 1996). También puede encontrarse en plasma en forma soluble (sICAM-1), al escindirse proteolíticamente de la membrana celular (van de Stolpe y van der Saag, 1996). La concentración de sICAM-1 en el sobrenadante de células endoteliales se ha correlacionado con el nivel de expresión en membrana (Leeuwenberg y col., 1992). Muchos estudios han observado una clara relación entre un aumento de los niveles circulantes de sICAM-1 con alteraciones con base inflamatoria, entre ellas la diabetes (Gearing y col., 1992; Fasching y col., 1996) siendo marcadores de enfermedades vasculares (Jager y col., 2000; Soedamah-Muthu y col., 2006).

Las células endoteliales expresan constitutivamente ICAM-1, pero ante un proceso inflamatorio los niveles de esta proteína en la superficie celular pueden ser incrementados por acción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e interfeón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) así como con LPS (Dustin y col., 1986; Myers y col., 1992; Pober y col., 1986), ésteres de forbol (Wertheimer y col., 1992) y estrés mecánico (Nagel y col., 1994; Tsuboi y col., 1995), mientras que su expresión puede ser inhibida por glucocorticoides (Cronstein y col., 1992). ICAM-1 juega un papel muy importante en procesos inflamatorios, participando en

la migración de leucocitos activados (monocitos, neutrófilos y células T) hacia los sitios de inflamación y participando en la formación y establecimiento de lesiones ateroscleróticas (Poston y col., 1992; Iiyama y col., 1999). ICAM-1, tanto en su forma anclada a la membrana como en su forma soluble, se une a dos integrinas pertenecientes a la subfamilia  $\beta_2$ , LFA-1 (Dustin y col., 1988; Marlin y Springer, 1987) y Mac-1 (Diamond y col., 1990; van de Stolpe y van der Saag, 1996). También se ha descrito su capacidad para unir otros ligandos como CD43 (molécula tipo mucina expresada por neutrófilos, monocitos, linfocitos T y B) (Rosenstein y col., 1991; Ardman y col., 1992), la molécula soluble de fibrinógeno (Languino y col., 1993) y el ácido hialurónico (McCourt y col., 1994). Por otro lado, es capaz de actuar como receptor para ciertos rinovirus (Staunton y col., 1989; Greve y col., 1989) y para eritrocitos infectados por *Plasmodium falciparum*. (Berendt y col., 1989; Ockenhouse y col., 1992), pero sólo el lugar de unión para LFA-1 se encuentra altamente conservado entre especies, apuntando a LFA-1 como el ligando más importante de ICAM-1 (Manning y col., 1995; Ockenhouse y col., 1992)

Otros miembros pertenecientes al grupo de las moléculas de adhesión intercelular son ICAM-2 (CD102) con dos dominios tipo Ig, presente en leucocitos, plaquetas y endotelio, y que también se une a LFA-1 (Staunton y col., 1989). A diferencia de los otros miembros de la familia, la expresión de ICAM-2 es constitutiva en el endotelio y no es inducible por citoquinas proinflamatorias (Staunton y col., 1989; Nortamo y col., 1991). Desempeña un papel importante en el tráfico leucocitario en tejidos no inflamados, participando en la recirculación de linfocitos (de Fougerolles y col., 1991). El tercer miembro, ICAM-3 (CD58), está formado por cinco dominios tipo Ig (Fawcett y col., 1992; de Fougerolles y Springer, 1992). Está presente en células endoteliales y leucocitos, pero además es la única que se expresa en neutrófilos (de Fougerolles y Springer, 1992).

La expresión de ICAM-1 en la superficie celular parece estar regulada fundamentalmente a nivel transcripcional aunque también puede darse la estabilización del ARN mensajero (ARNm) (Wertheimer y col., 1992). La expresión génica de ICAM-1 se encuentra modulada por varios factores de transcripción. Así se han encontrado dos elementos de unión para NF- $\kappa$ B, así como para Sp-1 y AP-1, en la región promotora del gen que codifica para ICAM-1 (Voraberger y col., 1991; Degitz y col., 1991).

#### Molécula de Adhesión de Células Vasculares-1 (VCAM-1)

La molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1) también conocida como CD106 o INCAM-110 es una proteína de 110 kDa perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas descrita inicialmente como molécula de adhesión endotelial inducida por citoquinas inflamatorias y LPS (Rice y Bevilacqua, 1989; Osborn y col., 1989). VCAM-1 une monocitos, células T y eosinófilos circulantes que expresen algunos de sus ligandos, la integrina VLA-4 o la integrina  $\alpha 4\beta 7$  (Elices y col., 1990; Chan y col., 1992). VCAM-1 se expresa en células endoteliales de la pared vascular, células dendríticas y células de músculo liso vascular (Couffinhal y col., 1993; Osborn y col., 1989). Las células endoteliales, en condiciones fisiológicas no expresan VCAM-1 en su superficie, sin embargo, la activación del endotelio por IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  o LPS da lugar a inducción de la transcripción génica (Marui y col., 1993) y la expresión de esta proteína (Osborn y col., 1989; Swerlick y col., 1992), en células endoteliales a través de la activación de NF- $\kappa$ B. Estudios de la región promotora del gen que codifica VCAM-1 contiene dos lugares en tándem de unión a NF- $\kappa$ B, (en la posición -63 y -77) necesarias para la respuesta transcripcional inducida por citoquinas (Neish y col., 1992; Iademarco y col., 1992). Igualmente se ha descrito la presencia de sitios de unión para AP-1 en el promotor de

VCAM-1 (Cybulsky y col., 1991). La expresión de VCAM-1 en la superficie celular da lugar a una firme adhesión celular y facilita la migración de leucocitos desde el torrente sanguíneo hacia los tejidos inflamados, por lo que la expresión vascular de VCAM-1 se ha asociado a una variedad de procesos inflamatorios y a la aparición de lesiones ateroscleróticas (Cybulsky y Gimbrone, 1991; Iiyama y col., 1999). VCAM-1 está formada por seis o siete dominios tipo Ig (VCAM-6D o VCAM-7D) (Hession y col., 1991; Cybulsky y col., 1991; Osborn y col., 1992) y se expresa tanto en grandes como en pequeños vasos tras la activación del endotelio. También existe una forma soluble de esta molécula (sVCAM-1) que es liberada proteolíticamente de la superficie celular y que, al igual que sICAM-1, es un marcador de riesgo cardiovascular (Jager y col., 2000; Soedamah-Muthu y col., 2006).

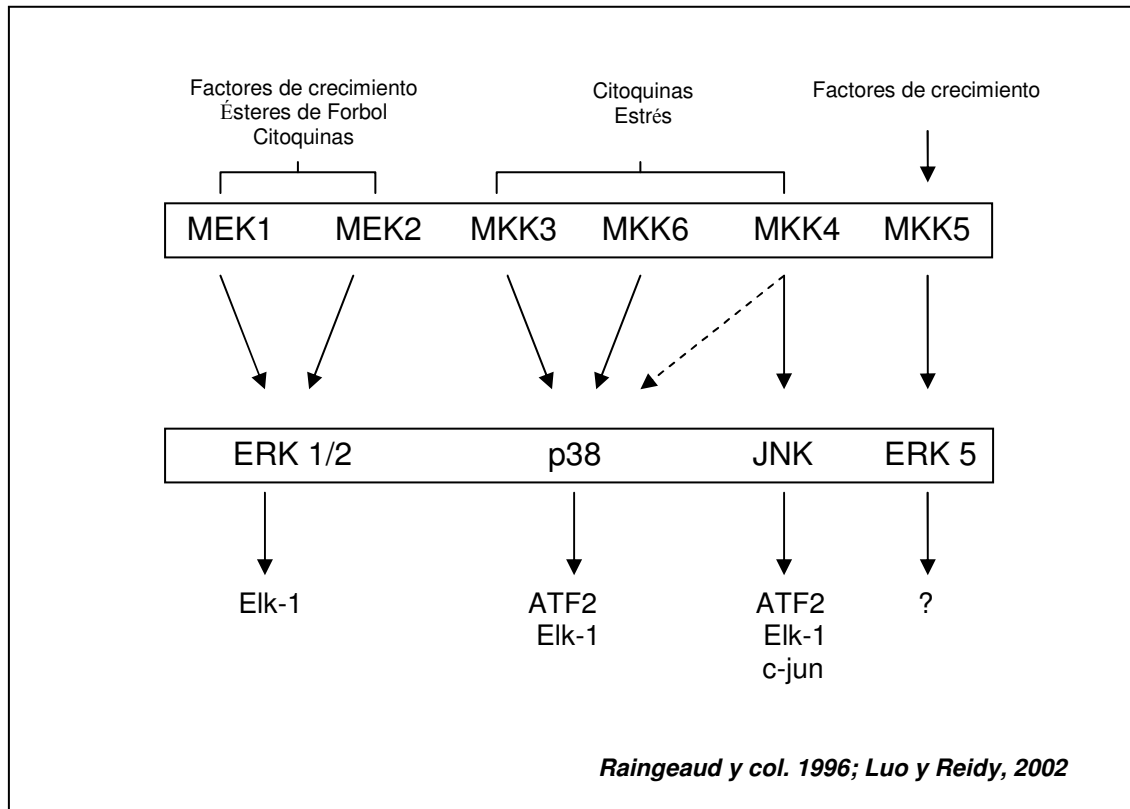
### **PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPKs)**

Las rutas de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) se encuentran entre los mecanismos de regulación de células eucariotas más extendidos. Las MAPKs forman una familia de quinasas que fosforilan residuos de serina/treonina y que responden ante una gran variedad de estímulos que actúan a través de diversas familias de receptores, incluyendo hormonas y factores de crecimiento, citoquinas pro-inflamatorias, péptidos vasoactivos y diferentes tipos de estímulos de estrés ambiental, como radiación ionizante, choque osmótico y daño isquémico (Kyriakis y Avruch, 2001). Las MAPKs intervienen en multitud de procesos tan diversos como el ciclo celular, proliferación y diferenciación, muerte celular, transcripción génica e inflamación (Kyriakis y Avruch, 2001).

Las vías de las MAPKs están formadas por tres grandes niveles constituidos por grupos de enzimas quinasas que se fosforilan sucesivamente, activándose las cascadas de señalización. En un primer nivel se encuentran las denominadas MAPK quinasas quinasas (MAPKKK o MAP3K) que pueden ser activadas mediante fosforilación. Estas MAP3K son capaces de fosforilar al grupo de quinasas que forman el segundo nivel de activación, las MAPK quinasas (MAPKK o MKK) que se encargan de activar las propias MAPK, que estarían formando el tercer nivel, mediante la fosforilación en los residuos treonina (Thr) y tirosina (Tyr) (Kyriakis y Avruch, 2001).

Hasta el momento se han descrito, cuatro rutas diferentes y paralelas de MAPK que incluyen la ruta de las quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK 1/2) o ruta de p42/p44 MAPK (Boulton y col., 1991), compuesta por dos proteína quinasas estrechamente relacionadas, implicadas en procesos de regulación del ciclo celular, diferenciación y procesos inflamatorios (Robbins y col., 1992; Kuldo y col., 2005). En 1994 se identificaron otras dos rutas independientes de MAPKs en mamíferos, la ruta de la quinasa NH<sub>2</sub>-terminal de c-Jun (JNK), también denominada proteína quinasa activada por estrés (SAPK) (Kyriakis y col., 1994) y la ruta de p38 MAPK (Han y col., 1994). JNK está compuesta por las isoformas p46/p54, también denominadas JNK1 y JNK2 (Kyriakis, 1994). Su activación depende de la fosforilación dual de los residuos treonina y tirosina del motivo Thr-Pro-Tyr a través de las quinasas de JNK 1 (JNKK1 o MKK4) (Dérjard y col., 1995). La activación de p38 MAPK depende de la fosforilación de los residuos Thr y Tyr del motivo Thr-Gly-Tyr por las quinasas MKK3 y MKK6 (Dérjard y col., 1995; Raingeaud y col., 1996). Ambas rutas son activadas por estrés ambiental (choque osmótico, choque térmico, radiación UV), por LPS y por citoquinas (Kyriakis y Avruch, 2001; Raingeaud y col., 1995).

En 1995 se identificó un cuarto miembro de la familia de las MAPKs, la gran quinasa 1 (BMK1) también conocida como quinasa regulada por señales extracelulares 5 (ERK5) que es sensible a estrés osmótico y estrés oxidativo (Lee y col., 1995).



**Figura 10: Representación esquemática de las rutas de transducción de señales de la familia MAPKs.** Se conocen cuatro familias independientes de MAPKs, pero pueden interaccionar entre ellas. Pueden ser activadas por diferentes estímulos como citoquinas, factores de crecimiento y estrés ambiental.

Los distintos miembros de MAPK son capaces de interactuar unos con otros de manera muy compleja. En los últimos años se ha descrito que, tanto en mamíferos como en levaduras, estas rutas paralelas de MAPK, junto con la ruta del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, son claves para la respuesta ante estímulos inflamatorios o de estrés. Asimismo, dependiendo del tipo celular, las MAPK pueden ser simultánea e independientemente estimuladas por IL-1 $\beta$  (Chen y col., 2000) y TNF- $\alpha$  (Zhou y col., 2007). Por ello, las



MAPKs se han convertido en potenciales dianas terapéuticas para nuevos fármacos antiinflamatorios (Kyriakis y Avruch, 2001).

### *Quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK)*

El descubrimiento del primer grupo de MAPKs en mamíferos se produjo en 1987 con la identificación de las MAPKs p44 y p42 (Ray y Sturgill, 1987), más tarde denominadas como quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK 1/2) (Boulton y col., 1991). Estas dos isoformas, estrechamente relacionadas entre sí, son activadas mediante la doble fosforilación de dos residuos, treonina y tirosina, próximos entre sí (Thr-Glu-Tyr) (Boulton y col., 1991). La cascada de señalización de la familia ERK está compuesta por los miembros Ras, Raf-1, MAPK/ERK quinasa 1/2 (MEK 1/2), y ERK 1/2 (Widmann y col., 1999; Brunet y Pouyssegur, 1997; Joneson y col., 1998). Existen dos isoformas de ERK: ERK1 y ERK2, también denominadas p44 y p42. ERK 1/2 se activan por diferentes estímulos, como estrés mecánico (Sumpio y col., 2005), péptidos vasoactivos como la Ang-II (Guo y col., 2006), por factores de crecimiento y por citoquinas inflamatorias (Kuldo y col., 2005). La activación de ERK está implicada en el proceso de diferenciación celular y con eventos relacionados con el ciclo celular (Robbins y col., 1992). La cadena de activación de la familia de ERK 1/2 ocurre en el citoplasma. ERK 1/2 es el único miembro de su ruta capaz de movilizarse desde el citoplasma hacia el núcleo tras su activación, permitiendo contactar con sus sustratos para su fosforilación (Lenormand y col., 1993).

Las distintas rutas de MAPKs pueden interrelacionarse entre sí. Así ERK 1/2 regula la expresión de la MAPK fosfatasa 2 (MKP2) la cual defosforila JNK, es decir, que ERK 1/2 es capaz de regular la actividad de JNK (Paumelle y col., 2000; Surapisitchat y col., 2001). ERK 1/2 puede modular la transcripción de genes inflamatorios regulando los

componentes de AP-1, ya que es capaz de inducir la síntesis de c-fos y otros miembros de la familia Fos (Chakraborti y Chakraborti, 1998). Asimismo, es capaz de modular la activación de NF- $\kappa$ B (Vanden Berghe y col., 1998).

La activación de ERK 1/2 se ha relacionado con la etiología de las complicaciones que acompañan a la diabetes. En modelos animales de diabetes se ha descrito un aumento de la fosforilación, y por tanto de la activación, de ERK 1/2 (Awazu y col., 1999). Igualmente, en pacientes diabéticos con nefropatía diabética se han encontrado aumentados los niveles activados de ERK 1/2 (Wong y col., 2007).

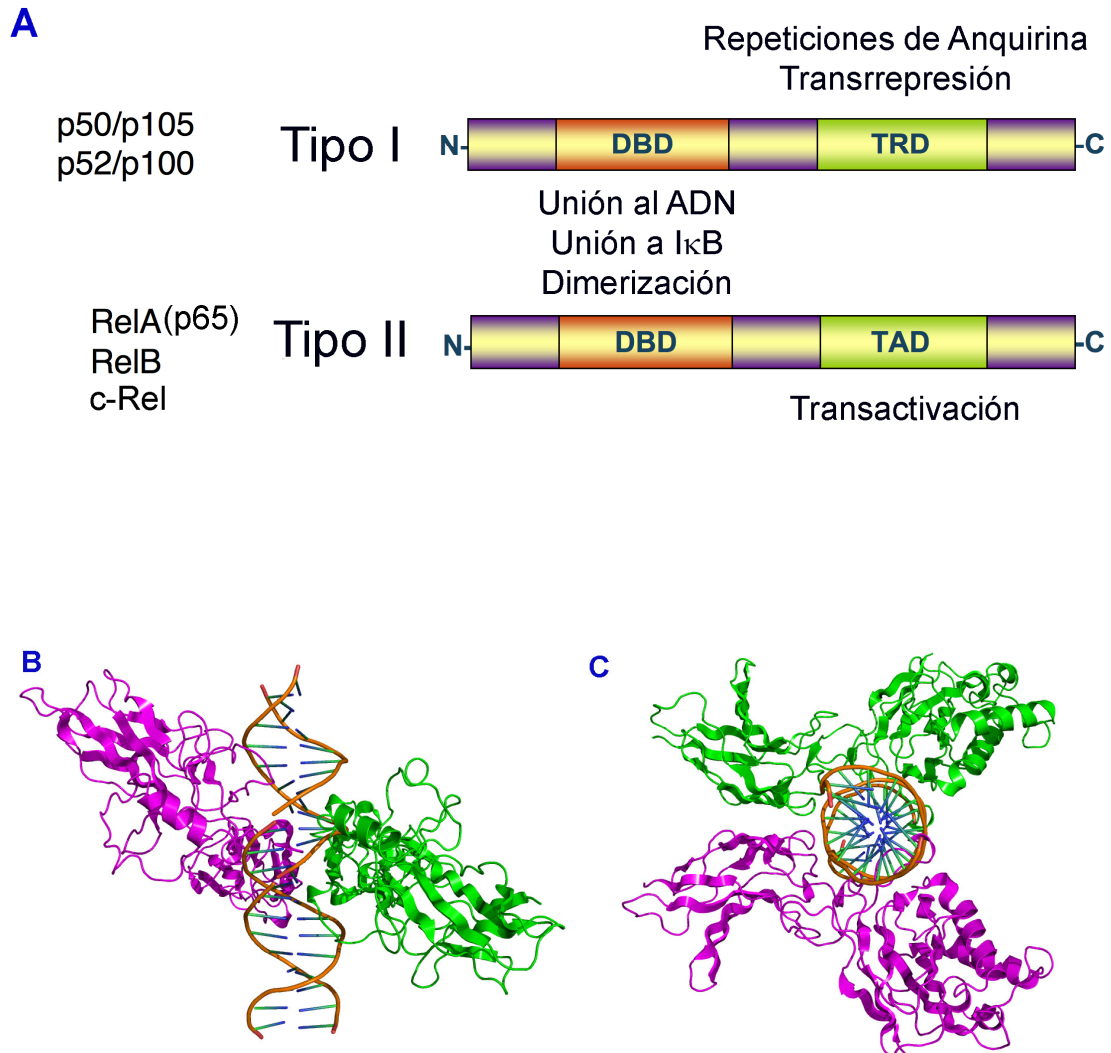
### **FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)**

El factor nuclear NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción génica, expresado en la mayoría de tipos celulares (Barnes y Karin, 1997), que desempeña un importante papel en la regulación de un gran número de genes inducibles implicados en procesos de inflamación y proliferación celular (Lenardo y Baltimore, 1989; Baeuerle, 1991, Collins y col., 1993). Así, se conocen al menos 150 genes regulados por NF- $\kappa$ B entre los que se encuentran numerosos genes relacionados con el desarrollo y perpetuación de un ambiente inflamatorio que fomenta el desarrollo de las complicaciones vasculares asociadas a la diabetes (Collins y Cybulsky, 2001). Entre estos genes se encuentran los que codifican para citoquinas inflamatorias como la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , quimiocinas como MCP-1 y las moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina (Kuldo y col., 2005).

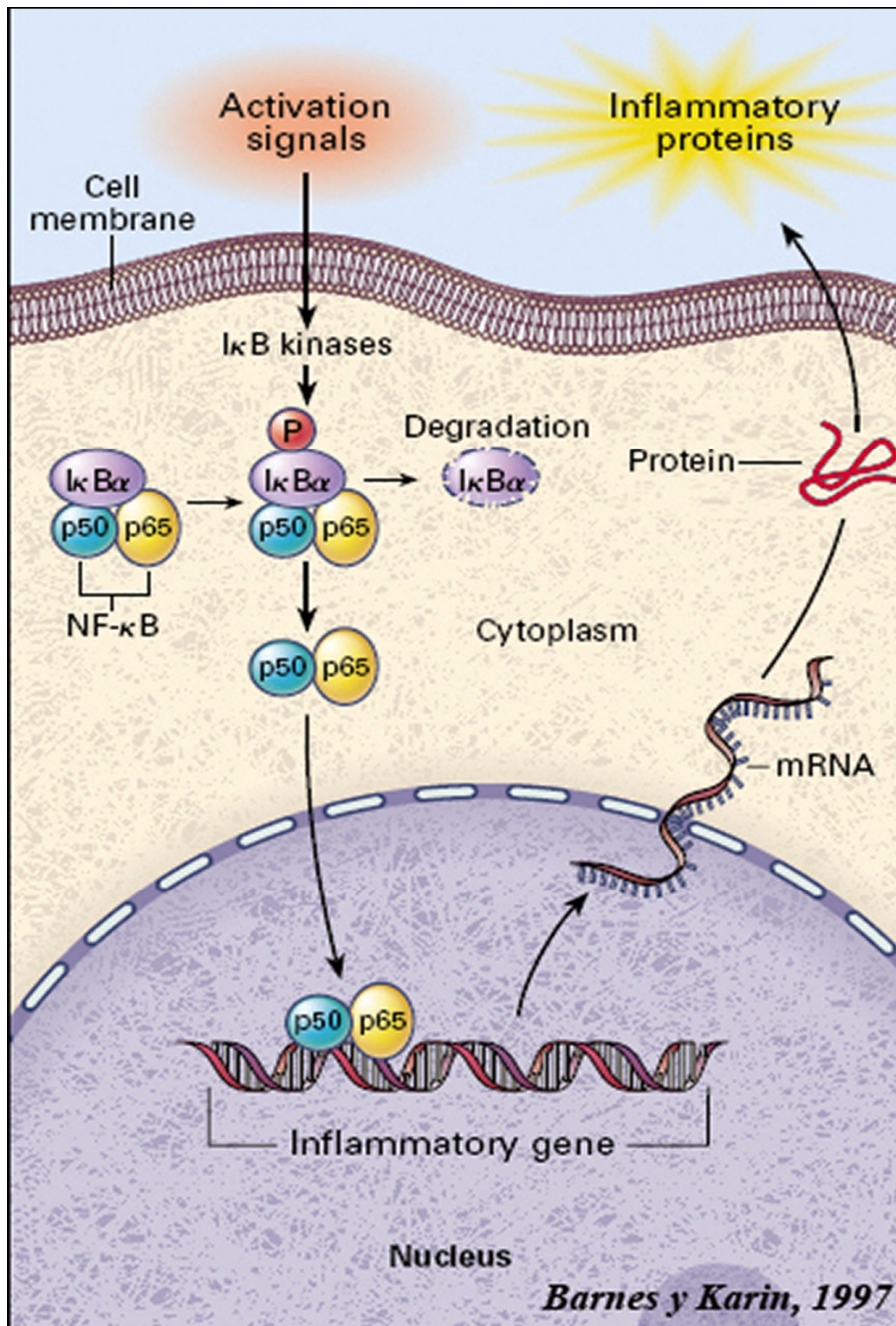
NF- $\kappa$ B forma complejos diméricos a partir de diferentes proteínas de la familia Rel: RelA o p65, RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1/p50 y NF- $\kappa$ B2/p52 (Beinke y Ley, 2004). Estas dos últimas proteínas son sintetizadas como p105 y p100, respectivamente, las cuales sufren

posteriormente una proteólisis parcial dando lugar a las proteínas NF- $\kappa$ B1/p50 y NF- $\kappa$ B2/p52 maduras (Beinke y Ley, 2004). Los complejos de NF- $\kappa$ B pueden formarse por la unión de dos subunidades iguales, como es el caso del homodímero formado por dos subunidades p50 o por la unión de dos subunidades diferentes, formando heterodímeros, de los cuales el más frecuente es el formado por las subunidades p65 y p50 (Grilli y col., 1993; Baeuerle y Henkel, 1994).

En mamíferos, la actividad de NF- $\kappa$ B está fuertemente regulada por la familia de proteínas inhibidoras de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), formada por varios miembros: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , p100 y p105 (los precursores de p52 y p50) (Baeuerle y Baltimore, 1988). En estado inactivo, los dímeros de NF- $\kappa$ B se encuentran en el citosol unidos a una de estas proteínas inhibidoras (Baeuerle y Baltimore, 1988). La estimulación por agentes proinflamatorios como la IL-1 $\beta$  o el TNF- $\alpha$  (Chen y col., 2000; Zhou y col., 2007), especies reactivas de oxígeno o el LPS activan los complejos I $\kappa$ B quinasa (IKK) (Karin, 1999), dando lugar a la fosforilación y poliubiquitinización, de la proteína inhibidora I $\kappa$ B (Baeuerle, 1991) y a su posterior degradación a través del proteasoma 26S, liberando los dímeros de NF- $\kappa$ B (Traenckner y col., 1994). Una vez activos, los dímeros de NF- $\kappa$ B se translocan al núcleo y allí se unen a la secuencia consenso (5'-GGGACTTTCC-3') presente en el promotor de diversos genes, iniciándose su transcripción. Tal es el caso de los promotores de las moléculas de adhesión ICAM-1 (Voraberger y col., 1991; Degitz y col., 1991) y VCAM-1 (Neish y col., 1992; Iademarco y col., 1992) así como de las enzimas iNOS (Lafuente y col., 2008; Yan y col., 1999; Kolyada y Madias, 2001) y COX (Kuldo y col., 2005). Ya que NF- $\kappa$ B activo regula la transcripción de numerosos genes implicados en inflamación y está presente en lesiones ateroscleróticas (Brand y col., 1996), NF- $\kappa$ B se considera como uno de los principales factores transcripcionales inflamatorios del sistema vascular.



**Figura 11: Factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B:** (A) Diagrama de la estructura de los dos tipos de proteínas de la familia NF- $\kappa$ B/Rel (tipo I y II). Ambos tipos poseen un dominio N-terminal de unión al ADN, donde también se encuentra el punto de dimerización y el sitio de unión a la proteína inhibidora I $\kappa$ B. El extremo C-terminal de las proteínas tipo I posee actividad represora, mientras que el dominio C-terminal del tipo II tiene función activadora. (B) Vista transversal y (C) lateral de la estructura cristalográfica de un dímero de NF- $\kappa$ B unido al ADN.



**Figura 12: Diagrama esquemático de la activación de NF-κB.** La activación de NF-κB implica la fosforilación de la proteína inhibidora IκB por las quinasas IκB (IKK) específicas y su posterior degradación proteolítica por el proteasoma. El NF-κB libre y activo migra al núcleo donde se une a secuencias específicas en las regiones promotoras de genes implicados en procesos inflamatorios, como las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1.

## ***Objetivos***

El objetivo global de este trabajo fue estudiar si la elevación de la concentración extracelular de D-glucosa puede actuar como un estímulo inflamatorio directo promoviendo la expresión de moléculas de adhesión y el reclutamiento leucocitario por parte del endotelio vascular.

Los objetivos concretos del trabajo fueron:

1. Estudiar el efecto directo de la elevación extracelular de D-glucosa sobre la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) en cultivo. Asimismo, estudiar dicho efecto en presencia de un estímulo inflamatorio conocido, como es la citoquina inflamatoria IL-1 $\beta$ .
2. Analizar el efecto de la elevación de D-glucosa, sola o en combinación con IL-1 $\beta$ , sobre la activación de moléculas de señalización implicadas en procesos inflamatorios, en particular ERK 1/2 y NF- $\kappa$ B, e investigar su implicación sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en HUVEC.
3. Estudiar si la elevación extracelular de D-glucosa se traduce en una elevación intracelular de D-glucosa en HUVEC. De manera similar estudiar si la IL-1 $\beta$  promueve un aumento de la concentración de D-glucosa intracelular.
4. Estudiar *in vitro* la repercusión funcional del aumento de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, estudiando la adhesión leucocitaria en HUVEC mediante una cámara de flujo.
5. Investigar si dicha repercusión funcional observada es trasladable a un modelo de rata *in vivo*, analizando la influencia de la elevación de D-glucosa, sola o en presencia de IL-1 $\beta$ , sobre diferentes parámetros de tráfico leucocitario estudiados mediante microscopía intravital.

## ***Materiales y Métodos***

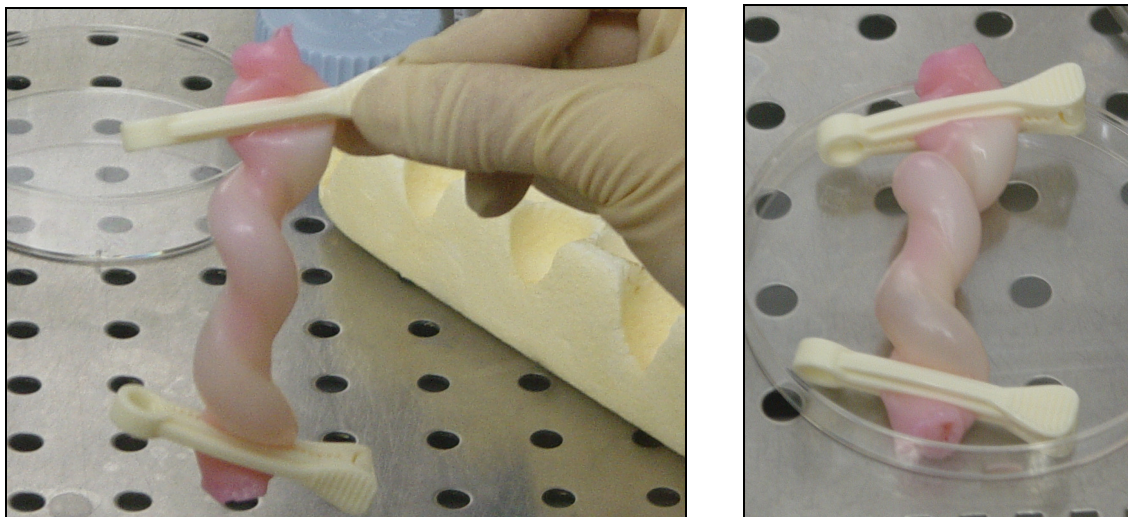


### **Obtención de cultivos celulares**

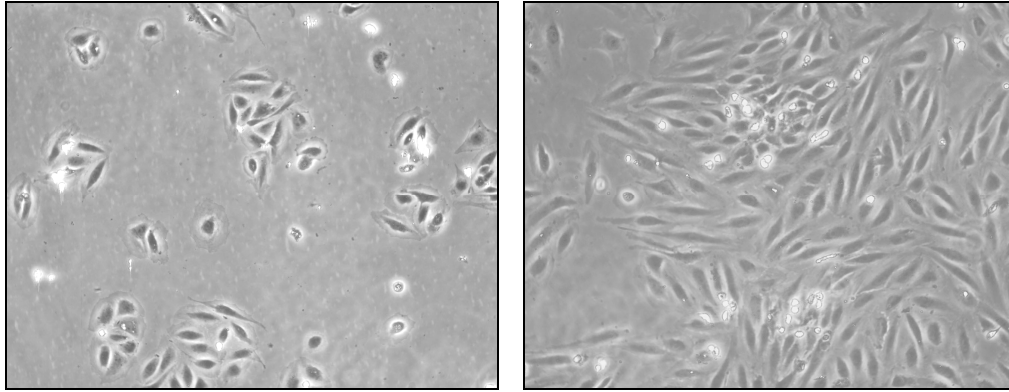
Las células endoteliales se obtuvieron de vena de cordón umbilical humano (HUVEC), utilizando en cada extracción celular tres cordones umbilicales con un protocolo aprobado por el comité ético del Hospital Universitario de Getafe (Peiró y col., 2007). Los cordones se recogieron en tubos estériles con medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Biological Industries, Beit Haemek, Israel), suplementado con 0,1 % de seroalbúmina bovina (BSA), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina, 2,5 µg/ml de anfotericina B y 0,05% de heparina. Antes de la extracción de las células endoteliales, los cordones se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril para eliminar restos de sangre y coágulos. Tras limpiar el interior de la vena con PBS, uno de los extremos del cordón se cerró con una pinza de clampar estéril y por el otro extremo se introdujeron 2 ml de una solución de collagenasa tipo II (2 mg/mL) disuelta en PBS y previamente filtrada. Tras clampar el otro extremo del cordón, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente permitiendo así la acción del enzima (Imagen 1). Pasado el periodo de incubación, se cortó uno de los extremos del cordón y se recogió en una placa de Petri estéril la solución de collagenasa arrastrando células endoteliales y hematíes. Para obtener el mayor número de células posibles, se lavó el interior de la vena con PBS, recogándose todo el eluyente. Este se añadió a un tubo estéril que contenía DMEM con 10% de suero fetal bovino (FCS; Biological Industries, Beit Haemek, Israel) y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. El precipitado resultante, se resuspendió y se centrifugó en las mismas condiciones repitiéndose este proceso otras dos veces hasta obtener el precipitado lo más limpio posible de glóbulos rojos. Tras la última centrifugación, el precipitado final se resuspendió en medio M199 (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) suplementado con 20% de FCS,

25  $\mu\text{g/ml}$  de suplemento de crecimiento de células endoteliales (ECGS), 100  $\mu\text{g/ml}$  de heparina y los antibióticos anteriormente mencionados, y se sembró en una placa de cultivo de 60 mm de diámetro cubierta previamente con colágeno tipo I disuelto en ácido acético 0,1 M al 0,03%. Este primer cultivo de células endoteliales se incubó en una estufa a 37° C con una atmósfera del 5% de  $\text{CO}_2$ , reemplazando el medio de cultivo cada dos días hasta alcanzar la confluencia. Para los experimentos posteriores se utilizaron las células entre los pases 1 y 5, que se realizaron mediante la utilización de tripsina al 0,05% (Imagen 2).

Para los ensayos de adhesión en condiciones de flujo, la línea celular de leucocitos HL-60 se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA) y se cultivó en medio RPMI-1640 (Biowhittaker, Walkersville, MD, USA) suplementado con 10% FCS y antibióticos.



**Imagen 1.** Extracción de células endoteliales a partir del cordón umbilical humano



**Imagen 2.** Cultivo primario de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) tras 24 h de su extracción (izquierda) y tras 72 h, en estado subconfluyente (derecha).

### **Caracterización celular**

Una vez establecido el cultivo se caracterizaron las células obtenidas con el fin de corroborar el tipo y la pureza del cultivo. Las células obtenidas formaron una monocapa con aspecto de empedrado, característica de las células endoteliales, y mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta se observó una tinción positiva frente al factor de Von Willebrand o factor VIII (Jaffe y col., 1973). Para su localización, se empleó un anticuerpo primario policlonal frente al factor VIII de células endoteliales (dilución 1/100; DAKO Corporation, CA, USA) y posteriormente un anticuerpo secundario unido a rodamina (dilución 1/100; Chemicon, Temecula, CA, USA). La técnica de inmunofluorescencia indirecta se explica con detalle más adelante.

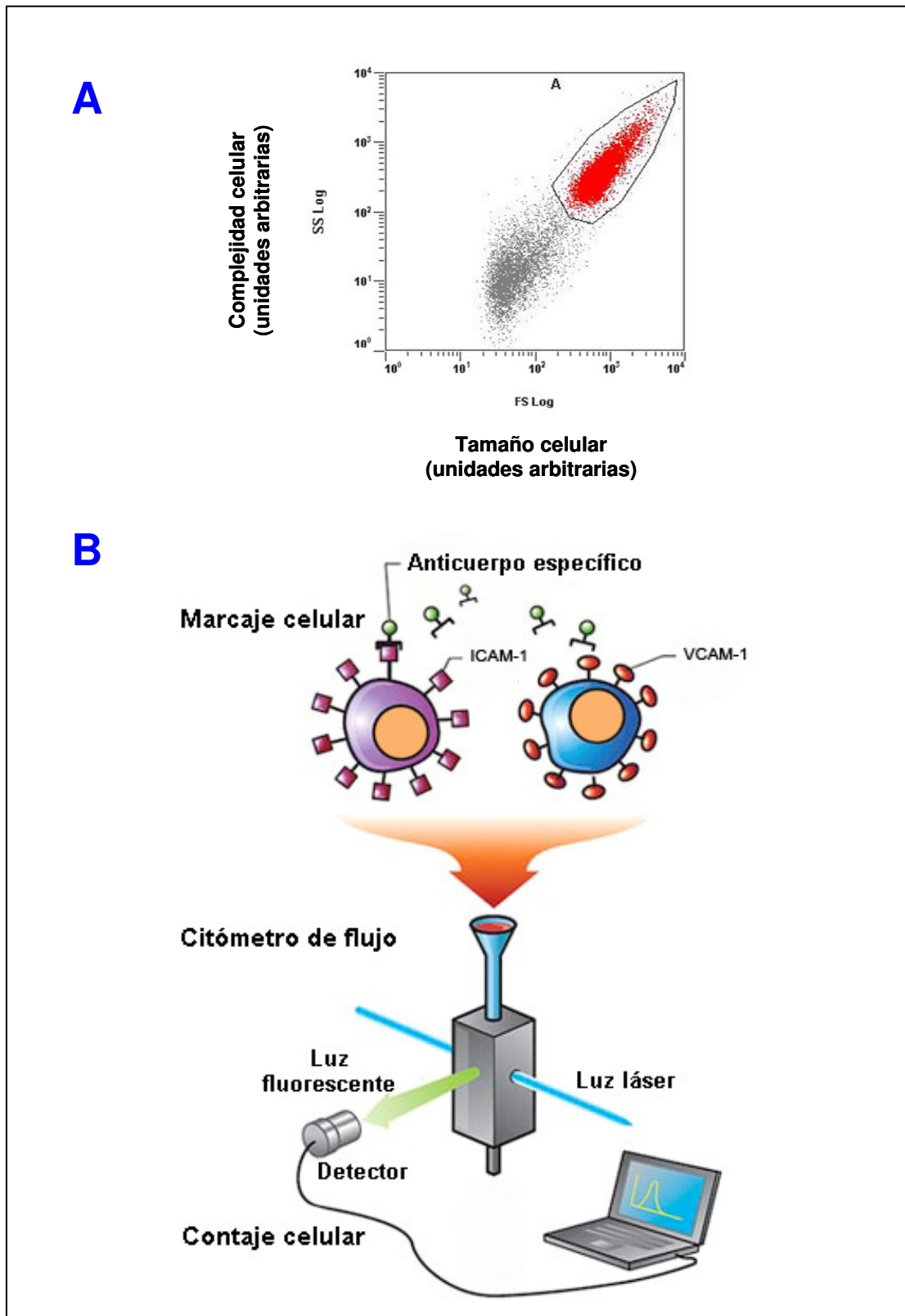
### **Protocolo experimental en cultivo celular**

Una vez establecidos cultivos celulares confluentes, se realizaron curvas con diferentes concentraciones de IL-1 $\beta$  (0,1 a 10 ng/ml) y de D-glucosa (5,5, 11 y 22 mM)

durante 18 h. Para los posteriores experimentos, las HUVEC se trataron durante 18 h con 5 ng/ml de IL-1 $\beta$ , en presencia de 5,5 ó 22 mM de D-glucosa.

### **Citometría de flujo**

Tanto la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 como del transportador de glucosa GLUT-1 se analizó mediante la técnica de citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos. Para ello se sembraron las HUVEC en placas de 6 pocillos y tras el tratamiento mencionado anteriormente, se recogieron las HUVEC utilizando una solución de tripsina disuelta en PBS al 0,05% y se fijaron con paraformaldehído al 2 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS, se incubó con una solución de PBS con 3% de BSA durante 30 minutos con el propósito de bloquear la unión de los anticuerpos a sitios inespecíficos. Posteriormente, se añadió el anticuerpo primario monoclonal frente a ICAM-1 (clon 6.5B5), VCAM-1(clon IE5) ambos de Chemicon, (Temecula, CA, USA) o GLUT-1 (N-terminal; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluidos 1/100 en una solución de PBS con 0,5% de BSA durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, y tras lavar con PBS, se añadió el anticuerpo secundario apropiado unido al fluoróforo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes-Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA; dilución 1/250) en PBS con 0,5% de BSA durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en 500  $\mu$ l de PBS y se mantuvieron a 4° C en oscuridad hasta su análisis en el citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA). Para el análisis, primero se seleccionó la población celular según su tamaño y su complejidad (figura 13). A continuación, se midió la intensidad de fluorescencia excitando el fluoróforo del anticuerpo secundario a 488 nm y recogiendo la luz emitida a 519 nm utilizando el programa informático Cell Quest (BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA).



**Figura 13: Citometría de flujo.** (A) Diagrama de puntos obtenido por citometría de flujo para la selección de la población celular a estudiar, HUVEC, seleccionada según el tamaño (FS) y la complejidad celular (SS). (B) Esquema explicativo del fundamento de la técnica de citometría de flujo.

**Inmunofluorescencia indirecta**

Las HUVEC se sembraron en cristales circulares estériles de 12 mm de diámetro (Menzel Glaser, Braunschweig, Alemania) y se dejaron crecer en medio M199 suplementado con 20% de FCS. Tras el tratamiento correspondiente, se visualizó el factor VIII, ICAM-1, VCAM-1, NF- $\kappa$ B y GLUT-1 mediante inmunofluorescencia indirecta según el protocolo descrito (Peiró y col., 2003). Primeramente, se eliminaron los restos de medio lavando suavemente con PBS y a continuación las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS, los sitios de unión inespecífica se bloquearon y se permeabilizó la membrana celular mediante una solución de PBS con suero de cabra al 4 % y Tritón X-100 al 0,1 %, durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron los anticuerpos primarios frente al factor VIII (1/100), ICAM-1, VCAM-1, la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA) o GLUT-1 todos ellos diluidos 1/100 en una solución de PBS con suero de cabra al 2 % y Tritón X-100 al 0,1 % y se incubaron a 4° C durante toda la noche. Posteriormente, las preparaciones se lavaron con PBS y se incubaron los anticuerpos secundarios correspondientes en cada caso unidos a rodamina (1/100) o Alexa Fluor 488 (1/250) durante 1 hora a temperatura ambiente, en la misma solución de PBS con suero de cabra al 2 % y Tritón X-100 al 0,1 %. Finalmente, tras lavar exhaustivamente con PBS, las preparaciones se montaron sobre un portaobjetos utilizando un medio acuoso rico en glicerol, que contenía 0,5  $\mu$ M de 4,6-diamidino-2-fenilindol 2HCl (DAPI; Molecular Probes-Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), colorante fluorescente que se une fuertemente al ADN, con el fin de visualizar los núcleos. En el caso de la inmunolocalización de NF- $\kappa$ B se utilizó únicamente el medio de montaje sin DAPI con el fin de visualizar el factor de transcripción translocado al interior del núcleo evitando el solapamiento de las longitudes de onda a la que emiten el DAPI (461 nm) y el

fluoróforo del anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (519 nm). Como control de la técnica se siguieron todos los pasos mencionados exceptuando el anticuerpo primario confirmando así que la tinción observada era específica y no se debía al fondo producido por la fluorescencia del anticuerpo secundario unido inespecíficamente. Las preparaciones se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia Eclipse TE300 (Nikon, Tokio, Japón) y las imágenes se capturaron con una cámara SPOT 1.3.0 acoplada al microscopio (con un objetivo de 40x y un ocular de 10x), utilizando como soporte informático el programa Adobe Photoshop 6.0. En cada experimento las microfotografías de las preparaciones se capturaron en las mismas condiciones de tiempo y ganancia.

### **Western blot**

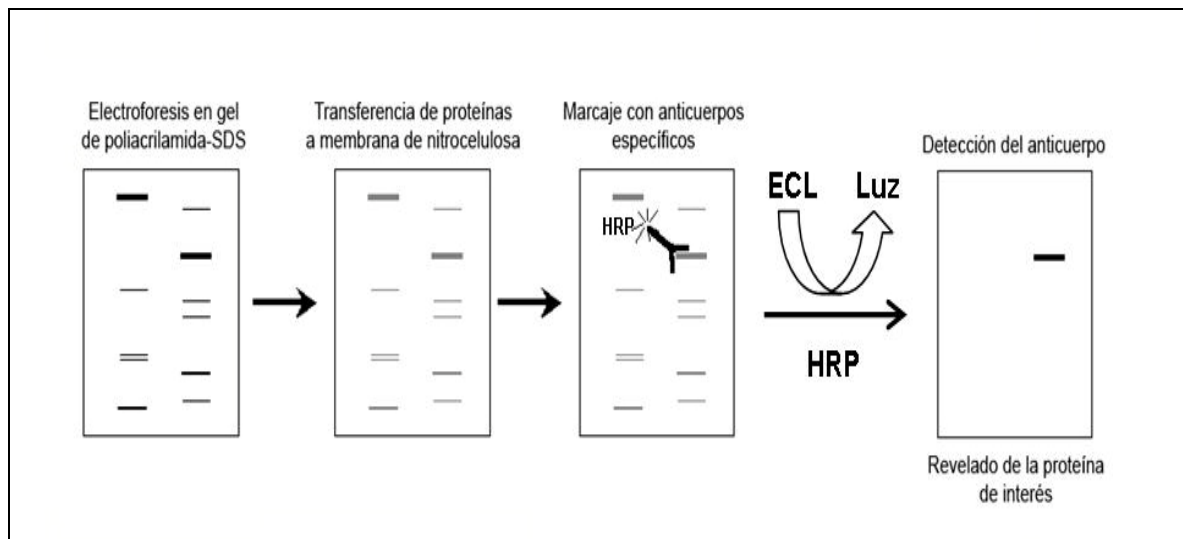
Los niveles de ERK 1/2 y de su forma fosforilada, así como del transportador GLUT-1, se cuantificaron mediante la técnica de Western blot. Para ello, se dejaron crecer las HUVEC en placas de Petri de 60 mm de diámetro. Una vez alcanzada la confluencia, las células fueron tratadas según el protocolo. En el caso de ERK 1/2 se utilizaron diferentes tiempos de incubación (5 – 60 min) para ver el curso de activación de ERK 1/2 a lo largo del tiempo. Para la cuantificación de GLUT-1, las HUVEC se trataron con concentraciones crecientes de IL-1 $\beta$  (0,1 a 10 ng/ml) o se incubaron en medio con diferentes concentraciones de D-glucosa (5,5 a 22 mM) durante 18 h. Paralelamente, las células fueron tratadas con IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) en presencia de 5,5 ó 22 mM de D-glucosa. Para la extracción de proteínas, tras cumplirse el tiempo de tratamiento, las células se lavaron con PBS y se añadió 150  $\mu$ l de tampón de lisis [25 mM de Tris pH 7,9, 0,5 mM de EDTA y los inhibidores de proteasas, 0,5 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 12,5  $\mu$ g/ml de aprotinina y 10 mM de ortovanadato sódico] y se dejó actuar durante 5 minutos

en hielo. Se utilizaron raspadores especiales para ayudar a la lisis celular mediante rotura mecánica de las membranas celulares. Los lisados celulares obtenidos se dejaron en hielo durante 15 min y se centrifugaron durante 1 min a 13.000 rpm a 4° C, desechando el precipitado y recogiendo el sobrenadante para medir la concentración de proteínas totales por el método colorimétrico del ácido bicinonínico (BCA ; Pierce, Rockford, IL, USA). Las muestras obtenidas se guardaron a -80° C hasta su posterior análisis.

Para la cuantificación de estas proteínas, los extractos celulares se separaron por electroforesis en condiciones desnaturizantes sometidos a una corriente constante de 110 V, utilizando para ello geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. Para ello, y una vez cuantificados los extractos proteicos, se utilizaron 20 µg de proteínas diluías en tampón de Laemli 4x [125 mM de Tris, 2% de dodecilsulfato sódico (SDS), 5% de glicerol, 1% de β-mercaptoetanol y 0,025% de azul de bromofenol] y se hirvieron las muestras durante 5 min a 100° C. Una vez separadas las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0,45 µm de diámetro (Schleider & Schuell BioScience, NH, USA) durante 3 horas a 300 mA constantes. Una vez transferidas las proteínas, la membrana se incubó durante 1 h a T<sup>a</sup> ambiente con una solución de Tris 0,4 M (pH 7,5), cloruro sódico (0,3 M) y 0,2% de Tween-20 (TBS-T) y 5% de leche en polvo desnatada para bloquear la unión de los anticuerpos posteriormente utilizados a sitios inespecíficos. A continuación se incubó la membrana con un anticuerpo policlonal contra ERK 1/2 o p-ERK 1/2 (dilución 1/1.000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA) y GLUT-1 durante toda la noche a 4° C, seguido de la incubación durante 1 h a T<sup>a</sup> ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) capaz de reconocer los anticuerpos primarios policlonales empleados (dilución 1/10.000; BioRad Laboratories, Madrid, España). Se detectaron las bandas inmunoreactivas mediante un kit comercial de quimioluminiscencia por luminol (ECL; Western blotting Detection System,



Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido) dando lugar, como resultado de la reacción catalizada por la peroxidasa, a la emisión de luz detectada mediante la exposición de películas de rayos X. Las bandas obtenidas se cuantificaron por densitometría utilizando el programa informático NIH Image 1.63 (figura 14).



**Figura 14: Esquema explicativo del fundamento de la técnica de Western blot.** Las proteínas obtenidas a partir de lisados celulares de HUVEC, se separan mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) en función de sus pesos moleculares. Posteriormente se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. Para la detección de la proteína en estudio se emplea un anticuerpo (primario) específico frente a dicha proteína reconocible por otro anticuerpo (secundario) ligado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP). Mediante un kit comercial (ECL), la HRP transforma el luminol en energía lumínica, detectada mediante películas fotográficas.

### Preparación de extractos nucleares

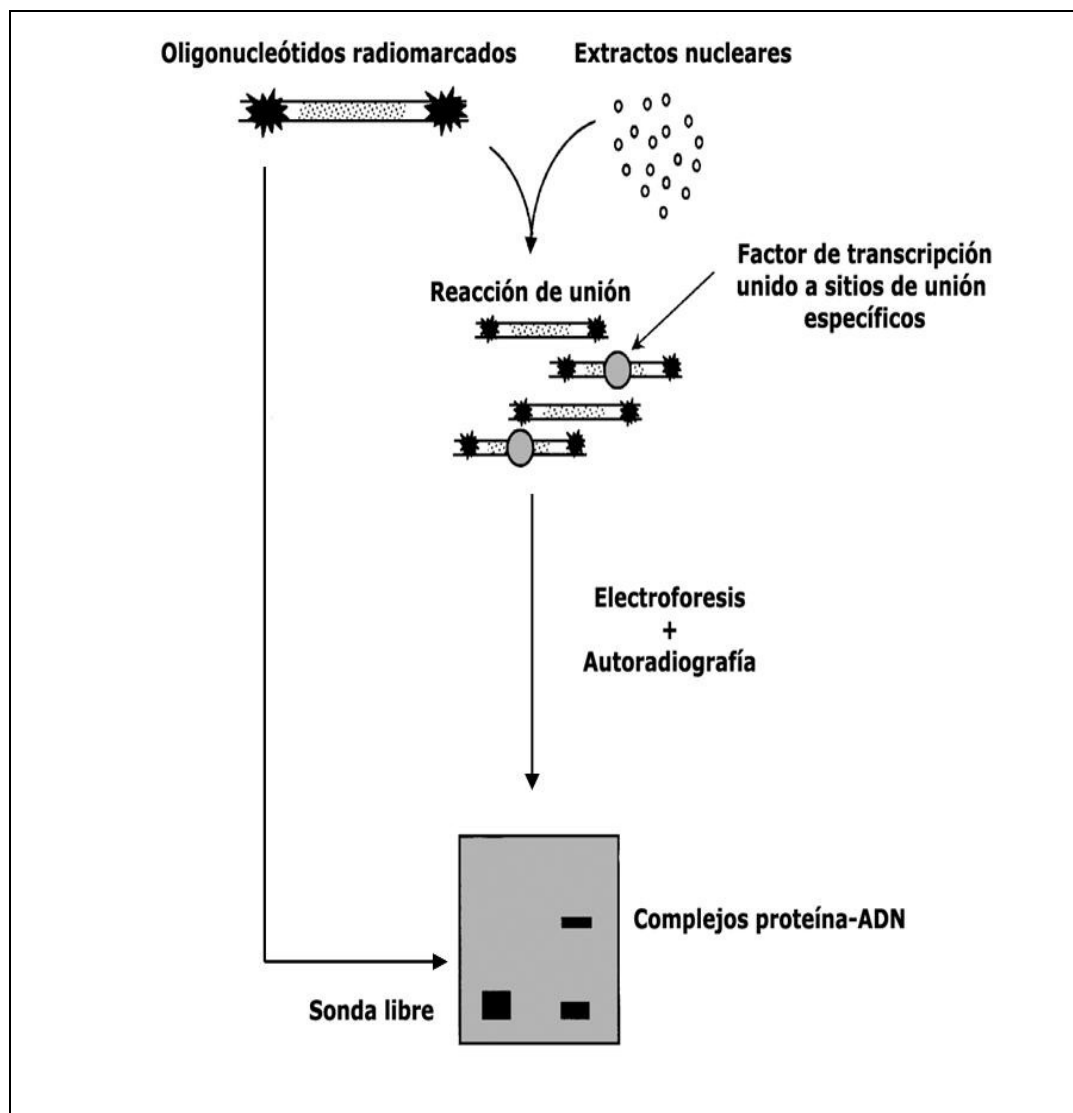
Las HUVEC se cultivaron en placas de 60 mm de diámetro, a las cuales se añadieron los tratamientos establecidos durante 1, 4, 6, o 18 h. Tras lavar dos veces con PBS frío, se añadió 200 µl de tampón de lisis A frío [10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM ditioneitol (DTT), 0,5 mM PMSF], y se rascaron las células. La suspensión celular obtenida se mantuvo 15 min en hielo. A continuación se

añadieron 12,5 µl de etilfenol polietilenglicol éter (Nonidet P-40; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) al 10 %, y se agitó vigorosamente durante 10 seg. Tras centrifugar a 13.000 rpm durante 30 seg, se desechó el sobrenadante (extracto citoplásmico y ARN) y el precipitado resultante se resuspendió en 50 µl de tampón C frío [20 mM Hepes pH 7,9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMS] y se agitó vigorosamente durante 15 min a 4° C. Se centrifugaron de nuevo durante 5 min a 13.000 rpm, se recogió el sobrenadante (extracto nuclear) y se almacenó a -80° C hasta su procesamiento. La concentración total de proteína se determinó mediante el método colorimétrico BCA.

### **Ensayos de retardo en gel (EMSA)**

La secuencia de NF-κB 5'-(AGTTGAGGGGACTTCCCAGGC) y su complementaria fueron suministradas por Sigma-Genosys (Cambridge, Reino Unido). La secuencia 5' se marcó con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP utilizando el enzima T4 polinucleótido quinasa, (Promega, Madison, WI, USA), se hibridó con su cadena complementaria 3' y se purificó con columnas MicroSpin™ G-25 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido). Para la reacción de unión, los extractos nucleares (2,5 µg) se incubaron en hielo durante 15 min en el tampón de reacción [40 mM HEPES (pH 7,0), 140 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 µg/µl BSA, 0,01% de Nonidet P-40, 4% de Ficoll y 0,05 µg/ml de poli(dI-dC)poli(dI-dC)]. A continuación se añadió el oligonucleótido de doble cadena marcado (~ 50.000 cpm), y se incubó la mezcla 20 min a temperatura ambiente. Para los ensayos de competición, se añadió a la mezcla de reacción un exceso (200x) de sonda de doble cadena sin marcar (sonda fría). Los complejos de proteína-ADN se separaron en gel de poliacrilamida al 4 % en condiciones no desnaturalizantes en TBE 0,5x [45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA (pH 8,0)] a 80 V durante 1 h a 4°C. Los geles se secaron y se

expusieron con una película para radiografías (X-Ray Film AX; Konica Minolta Holdings, Inc., Madrid, España) a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa NIH Image 1.63 (figura 15).

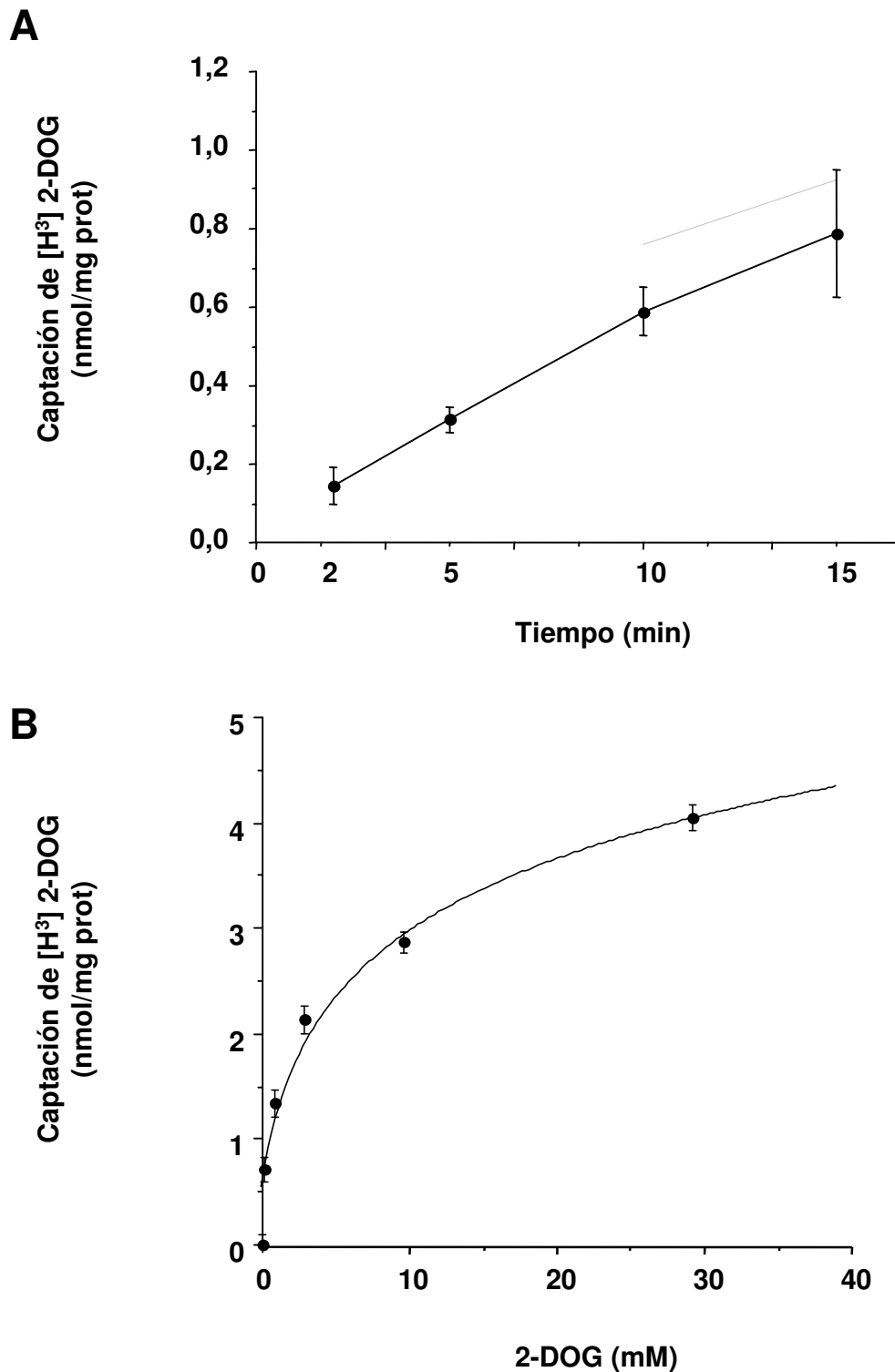


**Figura 15: Esquema explicativo del fundamento de la técnica de EMSA.** Los extractos nucleares obtenidos a partir de lisados celulares de HUVEC, se incuban con un oligonucleótido de doble cadena, previamente marcado con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , que contiene la secuencia específica del factor de transcripción en estudio, NF- $\kappa\text{B}$ , permitiendo así su unión. A continuación, la reacción obtenida se separa mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida. Las bandas específicas se detectan mediante autorradiografía mediante películas fotográficas.

### Captación de [ $^3\text{H}$ ]2-deoxiglucosa

Para los ensayos de captación de glucosa se utilizó el análogo de la glucosa, 2-deoxiglucosa marcado radiactivamente con tritio ([ $^3\text{H}$ ]2-DOG). Las HUVEC se sembraron en placas de 24 pocillos hasta alcanzar la confluencia. En el momento del tratamiento se cambió el medio de cultivo habitual por otro que contenía sólo 10% de FCS. Las HUVEC se trataron con concentraciones crecientes de IL-1 $\beta$  (1 a 10 ng/ml) o se incubaron en medio con diferentes concentraciones de D-glucosa (5,5 a 22 mM) durante 18 h. Tras el tratamiento las células se incubaron con una solución Krebs-Ringer HEPES [2,72 M NaCl, 94 mM KCl, 25 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM CaCl<sub>2</sub> y 200 mM HEPES pH 7,4] en ausencia de glucosa durante 1 h a 37° C, permitiendo que las HUVEC metabolizaran la totalidad de la glucosa captada del medio del cultivo durante el periodo de tratamiento, evitando que esto fuera un factor limitante para la posterior captación de glucosa. Primeramente se realizó una curva de tiempo con el fin de determinar el tiempo en el que la captación de glucosa fuera lineal. Para ello se incubó 0,1  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ]2-DOG (Perkin Elmer, BO, USA) durante 0, 2, 5, 10 y 15 min. (figura 16A). A continuación se determinó la concentración de 2-deoxiglucosa no marcada (2-DOG) que debía competir con 0,1  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ]2-DOG para poder observar diferencias en la captación de glucosa debidas a variaciones en la cantidad de transportadores en la membrana y no a diferencias en la afinidad de éstos, realizándose curvas de concentración entre 0,3 mM y 30 mM de 2-DOG (figura 16B) durante 10 min. Finalmente se eligió la concentración de 10 mM.

Una vez establecidos el tiempo de captación y la concentración de 2-DOG fría, se realizó una curva de concentración de IL-1 $\beta$  (1 a 10 ng/ml) durante 18 h. Para la captación de glucosa las células se incubaron con 0,1  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ]2-DOG y 10 mM de 2-DOG (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) durante 10 min a 37° C. Como control de la



**Figura 16: Captación de [H<sup>3</sup>]2-DOG.** Las HUVEC se incubaron con 0,1  $\mu$ Ci/ml de [H<sup>3</sup>]2-DOG **(A)** a diferentes tiempos (2 - 15 min) para determinar el tiempo en que la captación era lineal y **(B)** con concentraciones crecientes de 2-DOG fría (0,3 - 30 mM). El resultado se expresa como la media $\pm$ EEM de al menos tres experimentos independientes

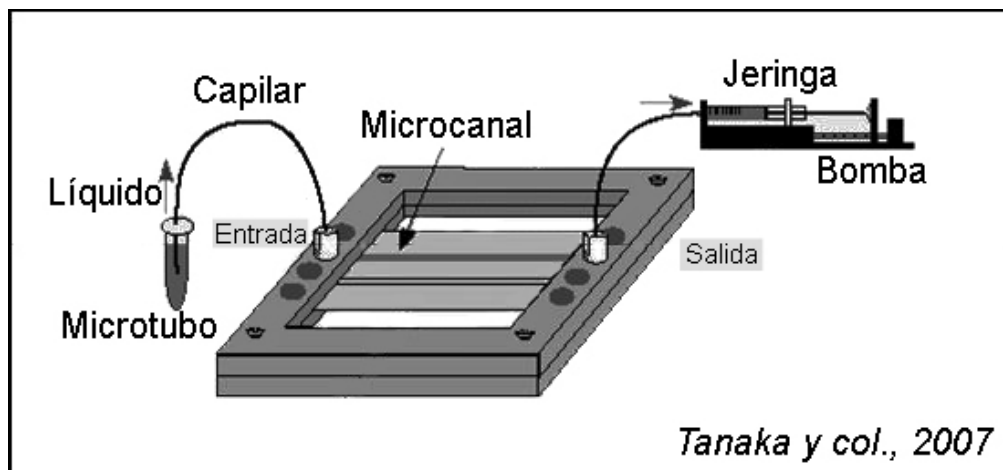
captación inespecífica no mediada por transportadores se preincubó 20  $\mu$ M de citocalasina B (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 15 min antes de comenzar el ensayo. Para detener la captación de  $[H^3]$ 2-DOG, las células fueron lavadas tres veces con una solución de Krebs-Ringer HEPES fría con 50 mM de 2-DOG y lisadas directamente con 500  $\mu$ l de una solución de NaOH 10 mM y SDS 0,1% durante 24 h. Se añadieron 3 ml de líquido de centelleo Ultima Gold (Perkin Elmer, BO, USA) a 200  $\mu$ l del extracto celular y se determinó la cantidad de radiactividad incorporada en un contador de centelleo líquido (Wallac 1409, Freiburg, Alemania).

Los valores de captación obtenidos fueron corregidos por la captación inespecífica obtenido en presencia de citocalasina B ( $21,54 \pm 4,35$  % de la captación total). La concentración de proteínas fue determinada por el método colorimétrico de Bradford (BioRad Laboratories, Madrid, España) utilizando el lisado celular, y el resultado fue expresado en mmoles/mg de proteína.

#### **Adhesión leucocitaria en cámara de flujo.**

Se sembraron las HUVEC en cubreobjetos de 25 mm de diámetro (Carolina Biological Supply, Burlington, CA) recubiertos con fibronectina (concentración 2  $\mu$ g/ml). Una vez alcanzada la confluencia y tras el tratamiento de las HUVEC, los cubreobjetos se colocaron en una cámara de flujo paralelo (Harvard Apparatus, Natick, MA, USA) consistente en una placa donde una goma de silicona forma un canal sobre la monocapa endotelial por donde se permite el flujo constante de células en suspensión gracias a una bomba de vacío conectada en un extremo que establece la velocidad de flujo mientras que por el otro extremo se añade el medio de perfusión. La temperatura de la placa se mantuvo

constante a 37° C. Antes de comenzar el ensayo se perfundió una solución de PBS con  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  y PBS sin  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  (1:1) y 0,4% de albúmina de suero humano (HSA) sin células, atemperada a 37 °C, para ajustar el flujo a 0,26 ml/min (que corresponde a un estrés de rozamiento de 0,5 dinas/cm<sup>2</sup>). A continuación se añadieron 2 ml de esta misma solución conteniendo  $1,5 \times 10^6$  HL-60/ml. Las células fueron visualizadas a través de un microscopio invertido Nikon TE2000 (Nikon Inc., Melville, NY, USA), y se grabaron al menos cinco campos diferentes, durante 10 seg cada uno, utilizando un objetivo de contraste de fase de 20x y oculares de 10x y el programa informático VideoLab (Ed Marcus Lbs, Newton, MA, USA). Los leucocitos en fase de rodamiento fueron fácilmente identificados ya que fluían más lentamente que el resto de células que fluían libremente. Aquellos leucocitos que establecieron un contacto estable con la monocapa endotelial durante al menos 30s se consideraron como adheridos. Se contabilizaron tanto las células en rodamiento como adheridas con el medio de perfusión aún fluyendo (figura 17).



**Figura 17:** Esquema de una cámara de flujo para el ensayo de adhesión leucocitaria. La cámara posee un espacio para la colocación de un cubreobjetos de cristal donde han crecido las HUVEC, y un termostato par mantener la temperatura constante. Una goma de silicona forma un canal por donde fluye la solución con leucocitos a una velocidad constante gracias a una bomba de succión

**Protocolo experimental *in vivo***

Se seleccionaron ratas macho Sprague-Dawley (SD) de entre 200-250 g de peso, con una glucemia basal de  $88,2 \pm 2,2$  mg/dl. Las ratas fueron sedadas con éter y se les administró por vía intraperitoneal (i.p), mediante una única inyección, 10 ml de solución salina (PBS), PBS con D-glucosa (40 mg/kg), PBS con IL-1 $\beta$  (200 ng/Kg) o PBS con D-glucosa e IL-1 $\beta$ . Se realizaron experimentos de control osmótico en paralelo, sustituyendo la D-glucosa por L-glucosa. Tras 18 h, se midieron parámetros hemodinámicos, así como indicadores del proceso de reclutamiento leucocitario, tanto en vénulas postcapilares como en arteriolas del mesentéreo. Los parámetros hemodinámicos medidos fueron la presión arterial media (mm de Hg) y la fuerza de dispersión ( $s^{-1}$ ) tanto en vénulas como en arteriolas. Los parámetros leucocitarios estudiados mediante microscopía intravital, que se describe más adelante, fueron el flujo y la velocidad de rodamiento leucocitario, el número de leucocitos adheridos a la pared vascular y el número de leucocitos migrados al espacio subendotelial en vénulas postcapilares mesentéricas, así como la adhesión de leucocitos a la pared de arteriolas mesentéricas.

**Microscopía intravital**

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (65 mg/kg; i.p) y se canularon la traquea, para facilitar la respiración, la vena yugular derecha y la arteria carótida izquierda para monitorizar la presión arterial media (PAM) a través de un transductor de presión conectado a un polígrafo.

A continuación se realizó una incisión en la línea media abdominal y se exteriorizó un segmento del yeyuno medio que se colocó sobre un pedestal a 37 °C que permitía la transiluminación de un área de 2 cm<sup>2</sup> de tejido. El mesentéreo expuesto se profundió continuamente con una solución tampón bicarbonatada (BBS; pH 7,4) a 37° C, a una

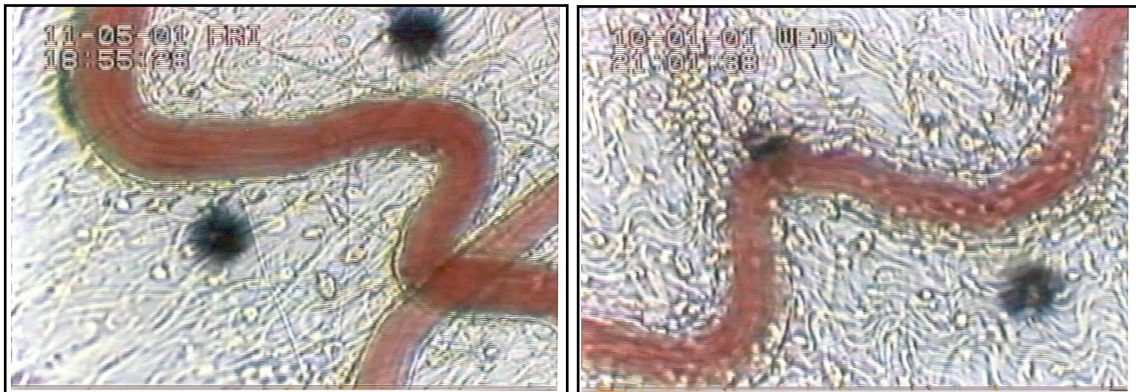


velocidad de flujo de 2 ml/min. La microcirculación mesentérica se observó a través de un microscopio ortostático (Nikon Optiphot-2 SMZ1) con un objetivo 20x y un ocular de 10x. Mediante una cámara de vídeo (Sony SSC-C350P) acoplada al microscopio, se proyectaron imágenes en un monitor a color (Sony Triniton PVM-14N2E), grabándose las mismas en un magnetoscopio (Sony STV-S3000P) que superpone el tiempo y la fecha para su análisis posterior. El aumento final de la imagen en el monitor fue de 1300x (Imagen 3).

Se seleccionaron vénulas o arteriolas mesentéricas no ramificadas de entre 25 y 40  $\mu\text{m}$  de diámetro medido con un video calibrador (Microcirculation Research Institute, Texas A&M University, Collage Station, Tex, USA). La velocidad de los glóbulos rojos ( $V_{\text{rbc}}$ ) en el torrente sanguíneo se midió con un velocímetro óptico Doppler (Microcirculation Research Institute). El flujo sanguíneo venular ( $V_{\text{mean}}$ ) se calculó aplicando diversos cálculos asumiendo una geometría cilíndrica ( $V_{\text{mean}}=V_{\text{rbc}}/1,6$ ) y la fuerza de dispersión ( $\gamma$ ) de la pared vascular se calculó basándose en la definición newtoniana  $\gamma=8 \times (V_{\text{mean}}/D_v) \times \text{s}^{-1}$ , donde  $D_v$  es el diámetro vascular (House y Lipowsky, 1987).

El número de leucocitos en fase de rodamiento, adheridos y migrados, así como su velocidad, fueron determinados posteriormente mediante análisis de las imágenes grabadas en las cintas de video. Se define leucocito en fase de rodamiento cuando éste se mueve a menor velocidad que los eritrocitos del torrente sanguíneo. El flujo de leucocitos en rodamiento corresponde al número de leucocitos que cruzan un punto de referencia del vaso durante un minuto (células/min). La velocidad de rodamiento viene dada por el tiempo que requiere un leucocito en rodamiento para recorrer 100  $\mu\text{m}$  de microvaso y es expresada en  $\mu\text{m/s}$ . Se considera que un leucocito está adherido al endotelio vascular si permanece estacionado al menos 30 segundos; la adhesión leucocitaria se expresa como el

número de leucocitos adheridos por 100  $\mu\text{m}$  de microvaso. La migración de los leucocitos se expresa como el número de glóbulos blancos migrados por campo visual rodeando el vaso en estudio.



**Imagen 3: Micrografías representativas obtenidas por microscopía intravital.** Vénulas mesentéricas postcapilares en ausencia de leucocitos en fase de rodamiento, adheridos o migrados (izquierda) o con un visible número de leucocitos en proceso de reclutamiento (derecha)

## **Materiales**

El suero, la tripsina y los medios de cultivo se obtuvieron de Biological Industries, Beit Haemek, Israel y el material plástico estéril para el cultivo de células de Techno Plastic Products AG (TPP; Trasadingen, Suiza). La IL-1 $\beta$  y la D-glucosa fueron suministradas por PeproTech (Londres, Reino Unido) y Serva (Heidelberg, Alemania), respectivamente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron frente a ICAM-1 y VCAM-1 ambos de Chemicon (Temecula, CA, USA), frente al factor VIII (DAKO Corporation, CA, USA), frente a la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B y c-jun (Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA), y frente a GLUT-1 (N-terminal; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

Los anticuerpos secundarios unidos a rodamina o HRP fueron proporcionados por Chemicon (Temecula, CA, USA), mientras que los anticuerpos Alexa Fluor 488 y el DAPI se obtuvieron de Molecular Probes-Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). Las membranas de nitrocelulosa fueron suministradas por Schleider & Schuell. Las películas fotográficas se obtuvieron de Konica (Konica Minolta Holdings, Inc., Madrid, España). Amersham Pharmacia Biotech suministró el kit de detección ECL, las columnas MicroSpin G-25 y el poli(dI-dC)poli(dI-dC) (Buckinghamshire, Reino Unido). La L-glucosa, la citocalasina B, el inhibidor de NF- $\kappa$ B ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC), el inhibidor de la quinasa ERK 1/2, PD 98059 y el resto de reactivos fueron suministrados por Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M.). El análisis estadístico se realizó mediante *t* de Student, para comparación de valores discretos, o análisis de la varianza (ANOVA) en el caso de las curvas. Se consideró significativo un valor de *p* inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## ***Resultados***

## CARACTERIZACIÓN CELULAR

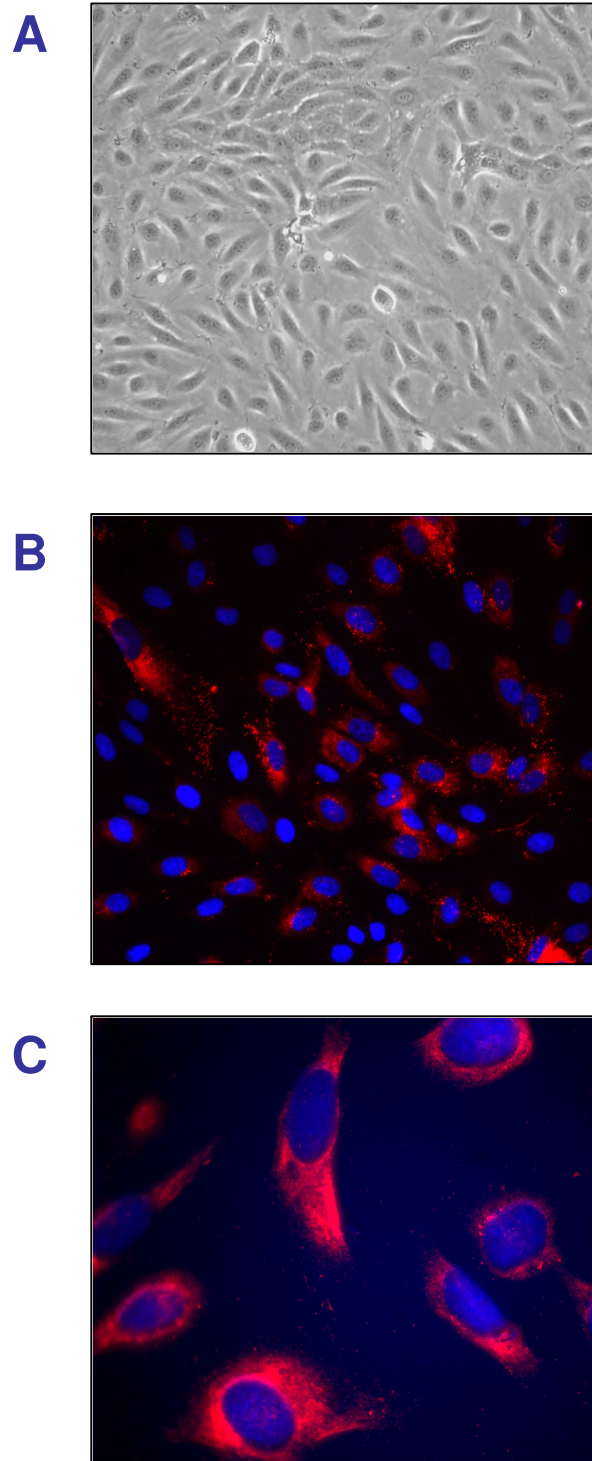
Los cultivos celulares obtenidos se caracterizaron tanto morfológicamente como por técnicas inmunológicas. Así, las HUVEC, observadas bajo microscopía de contraste de fase, presentaron una morfología poligonal formando un “empedrado” característico de las células endoteliales (figura 18A). Mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta se detectaron, empleando anticuerpos específicos, los gránulos de factor de von Willebrand o factor VIII almacenados en los cuerpos de Weibel-Palade, característicos de células endoteliales, y distribuidos por todo el citosol celular (figuras 18B y 18C). Una vez confirmada la obtención de células HUVEC, estos cultivos sirvieron de material biológico para la realización de los experimentos posteriores.

## EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN ICAM-1 Y VCAM-1 EN HUVEC.

### *Determinación de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en la superficie celular.*

#### Estudios de citometría de flujo

La expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en la superficie celular de las HUVEC en cultivo se cuantificó mediante citometría de flujo. La concentración base de D-glucosa en el medio es de 5,5 mM (equivalente a una glucemia de 110 mg/dl). El aumento de la concentración de D-glucosa en el medio de cultivo (de 5,5 mM a 11 y 22 mM) durante 18 h no modificó la expresión de ICAM-1 ni de VCAM-1 (figura 19A y 19B). Para los siguientes experimentos se empleó como concentración elevada de D-glucosa 22 mM (equivalente a 396 mg/dl).



**Figura 18: Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC).** (A) Micrografía de contraste de fase de un cultivo confluyente de HUVEC formando un modelo de empedrado característico de las células endoteliales, 200x. Caracterización de las HUVEC mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando un anticuerpo específico frente al factor de von Willebrand o factor VIII (B) 200x y (C) 1000x.

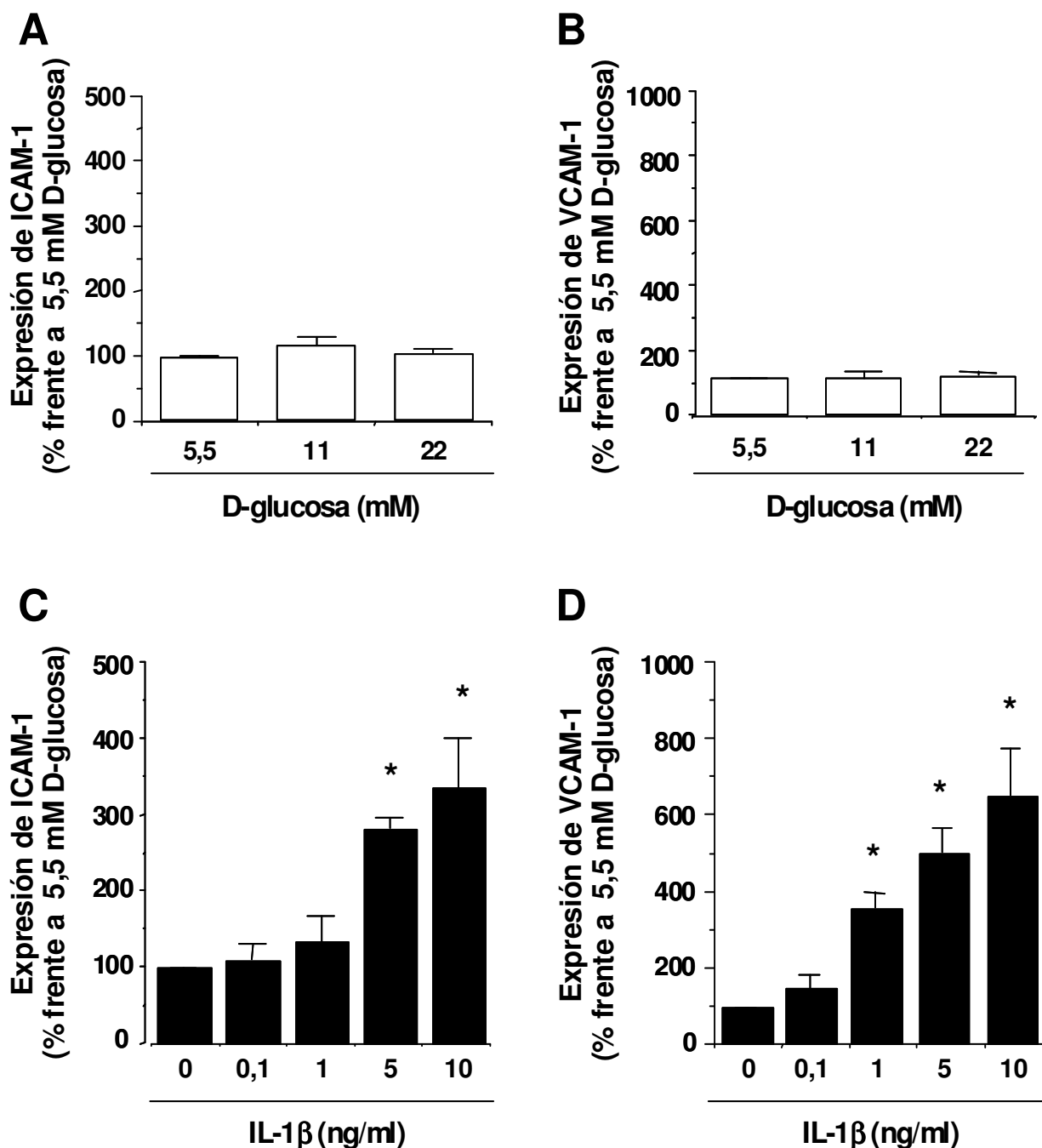
Igualmente, se cuantificó la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 tras el tratamiento de las HUVEC durante 18 h con concentraciones crecientes de IL-1 $\beta$  (0,1 a 10 ng/ml) en presencia de 5,5 mM de D-glucosa. La IL-1 $\beta$  provocó un aumento en la expresión tanto de VCAM-1 como de ICAM-1 en la superficie celular, que fue directamente proporcional a la concentración empleada. Se observó un efecto submáximo con la concentración de 5 ng/ml, que fue la concentración elegida para los siguientes experimentos (figura 19C y 19D).

Con el fin de evaluar el efecto conjunto de la IL-1 $\beta$  y la D-glucosa a concentraciones elevadas, se trataron las HUVEC con 5 ng/ml de IL-1 $\beta$  en un medio que contenía 22 mM de D-glucosa durante 18 h. El aumento de las CAMs inducido por la IL-1 $\beta$  aumentó de manera significativa cuando la D-glucosa del medio se incrementó de 5,5 mM a 22 mM (figura 20A y 20B).

Este efecto sinérgico observado entre la D-glucosa y la IL-1 $\beta$  no fue atribuible a la hiperosmolaridad. En efecto, cuando se reemplazó el aumento de D-glucosa por un nivel equivalente de su análogo no metabolizable L-glucosa (16,5 mM de L-glucosa añadido a 5,5 mM de D-glucosa del medio), no se reprodujo el efecto sinérgico visto anteriormente en presencia de D-glucosa. Tampoco la incubación de las HUVEC con altas concentraciones de L-glucosa (16,5 mM de L-glucosa añadido a 5,5 mM de D-glucosa del medio) en ausencia de IL-1 $\beta$  modificó la expresión de ninguna de las dos moléculas de adhesión estudiadas (figura 21A y 21B).

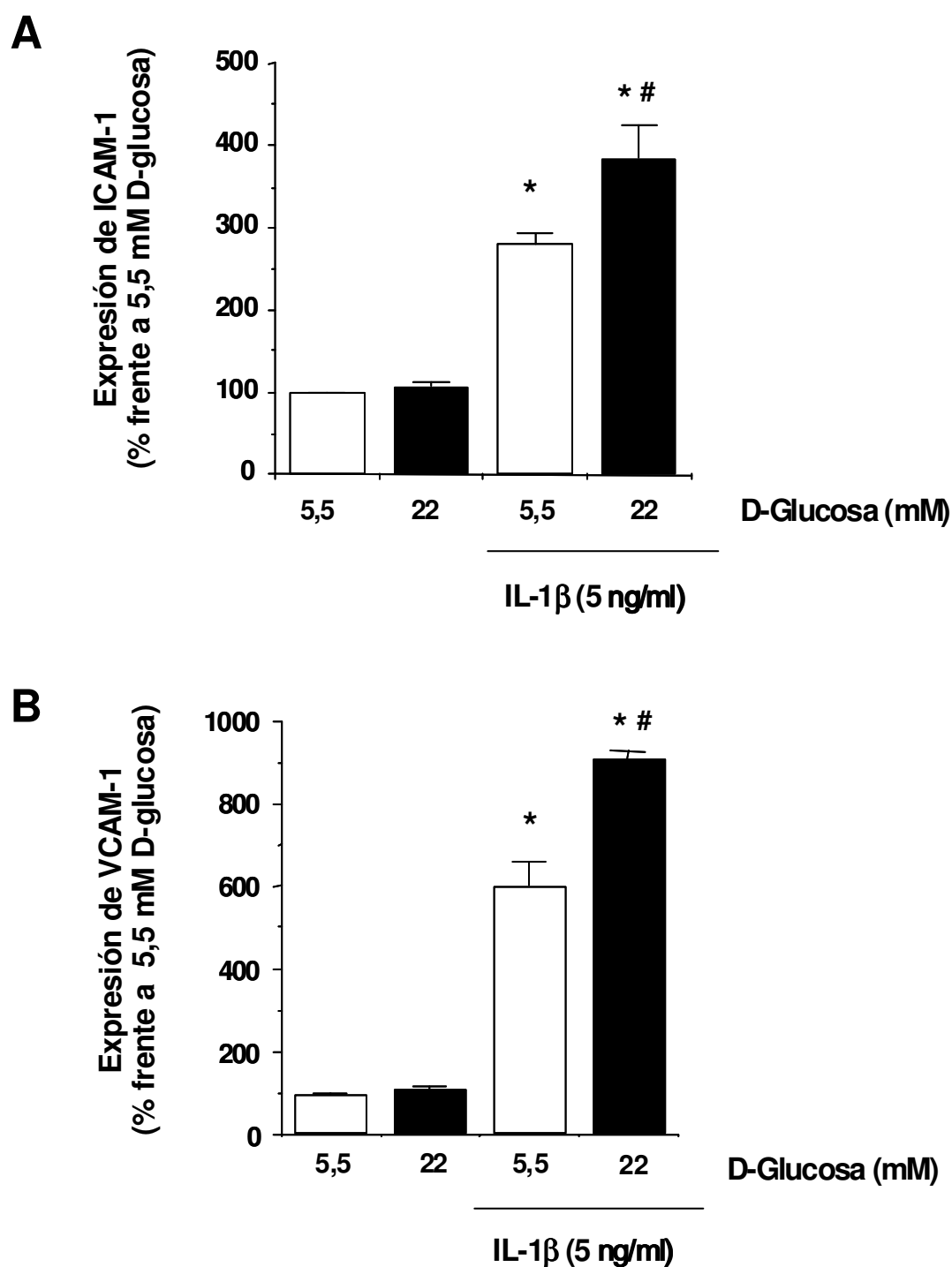
#### Estudios de Inmunolocalización

La expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en la superficie celular se visualizó mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta, confirmándose los resultados obtenidos

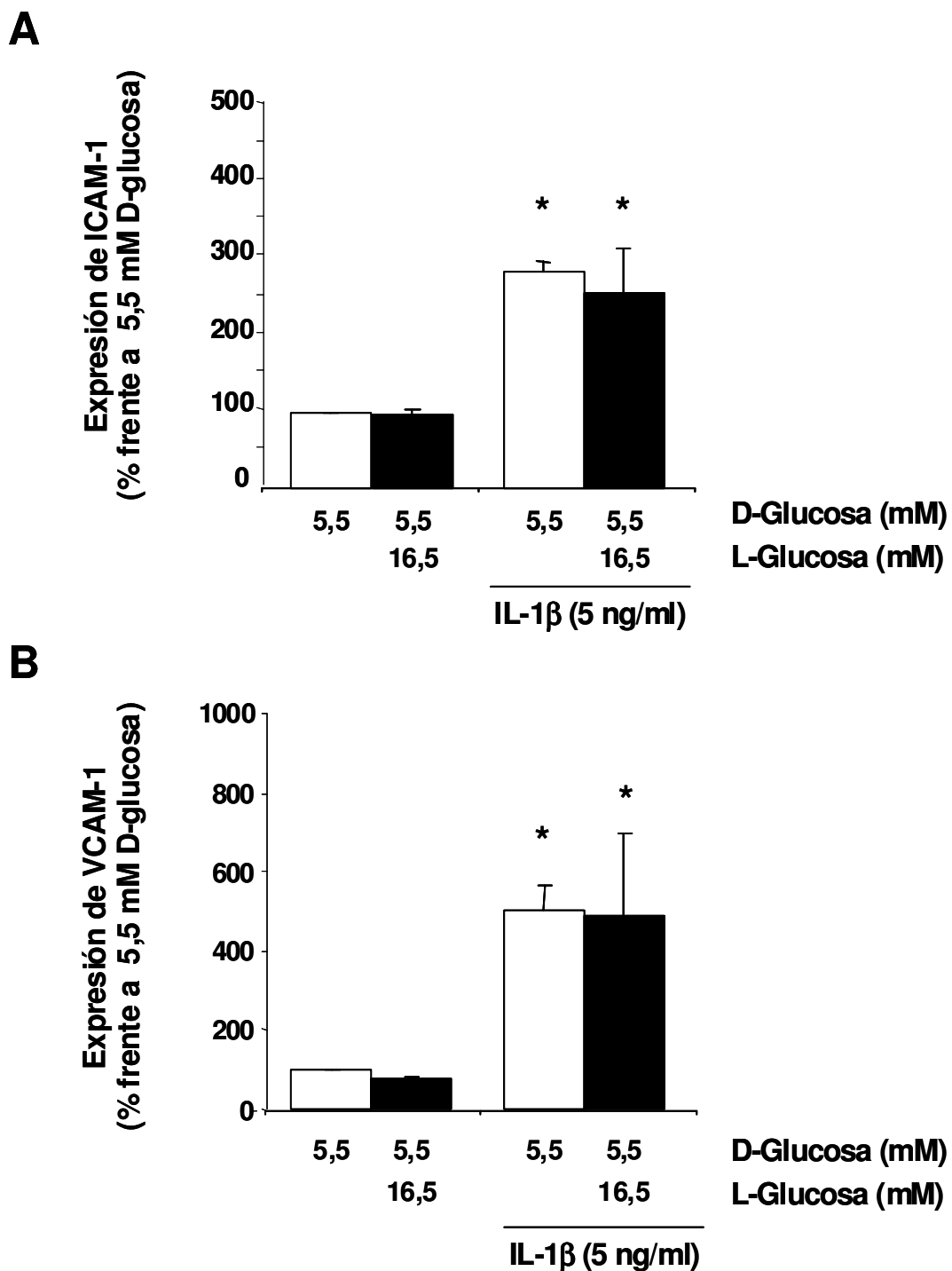


**Figura 19: Efecto de la D-glucosa y la IL-1β sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en la superficie celular de las HUVEC.** Las HUVEC fueron incubadas durante 18 h en un medio que contenía 5,5 mM, 11 mM ó 22 mM de D-glucosa y se determinaron los niveles de (A) ICAM-1 y (B) VCAM-1 mediante citometría de flujo. Igualmente las células se trataron con concentraciones crecientes de IL-1β (0,1-10 ng/ml) y tras 18 h se cuantificaron los niveles de (C) ICAM-1 y (D) VCAM-1. El resultado se expresa como la media±EEM del al menos cinco experimentos independientes (\*  $p < 0,05$  respecto de 5,5 mM de D-glucosa).





**Figura 20: Efecto del tratamiento combinado de D-glucosa e IL-1β en la expresión de (A) ICAM-1 y (B) VCAM-1 en la superficie celular de las HUVEC.** Las HUVEC fueron incubadas durante 18 h en un medio que contenía 5,5 mM ó 22 mM de D-glucosa en presencia o ausencia de IL-1β (5 ng/ml) y se determinaron los niveles de (A) ICAM-1 y (B) VCAM-1 mediante citometría de flujo. El resultado se expresa como la media±EEM de al menos cinco experimentos independientes (\*  $p < 0,05$  respecto de 5,5 mM de D-glucosa, #  $p < 0,05$  respecto de IL-1β + 5,5 mM de D-glucosa).



**Figura 21: El efecto potenciador de la D-glucosa sobre la acción de la IL-1 $\beta$  no se debió a la hiperosmolaridad.** Efecto de la adición de L-glucosa (16,5 mM) al medio durante 18 h, en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) y cuantificación de la expresión de **(A)** ICAM-1 y **(B)** VCAM-1 por citometría de flujo. El resultado se expresa como la media $\pm$ EEM de al menos tres experimentos independientes. (\*  $p < 0,05$  respecto de 5,5 mM de D-glucosa).

anteriormente por citometría de flujo. La IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) aumentó la expresión tanto de ICAM-1 como de VCAM-1 en la superficie celular de las HUVEC, mientras que la mera elevación de la concentración de D-glucosa no modificó la expresión de ambas moléculas. Mediante esta técnica, también se pudo observar el efecto sinérgico entre IL-1 $\beta$  y 22 mM de D-glucosa en la expresión de las CAMs, visualizadas en la superficie de las HUVEC (figura 22A y 22B).

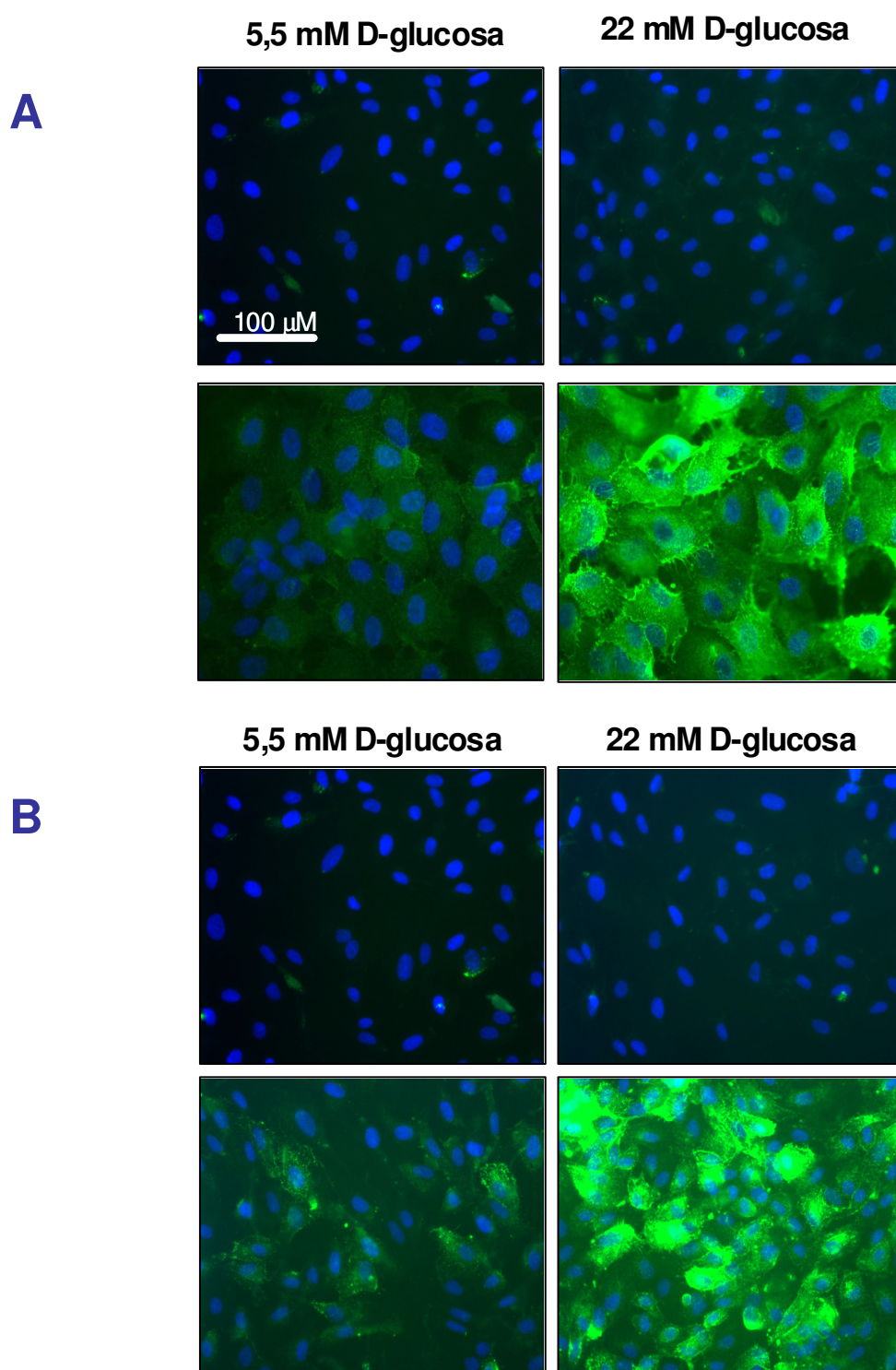
## **RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE ICAM-1 Y VCAM-1**

### ***Papel de ERK 1/2 en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en HUVEC***

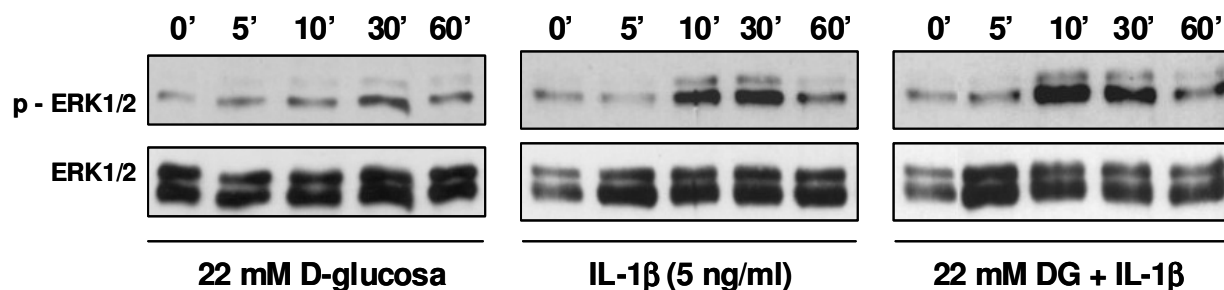
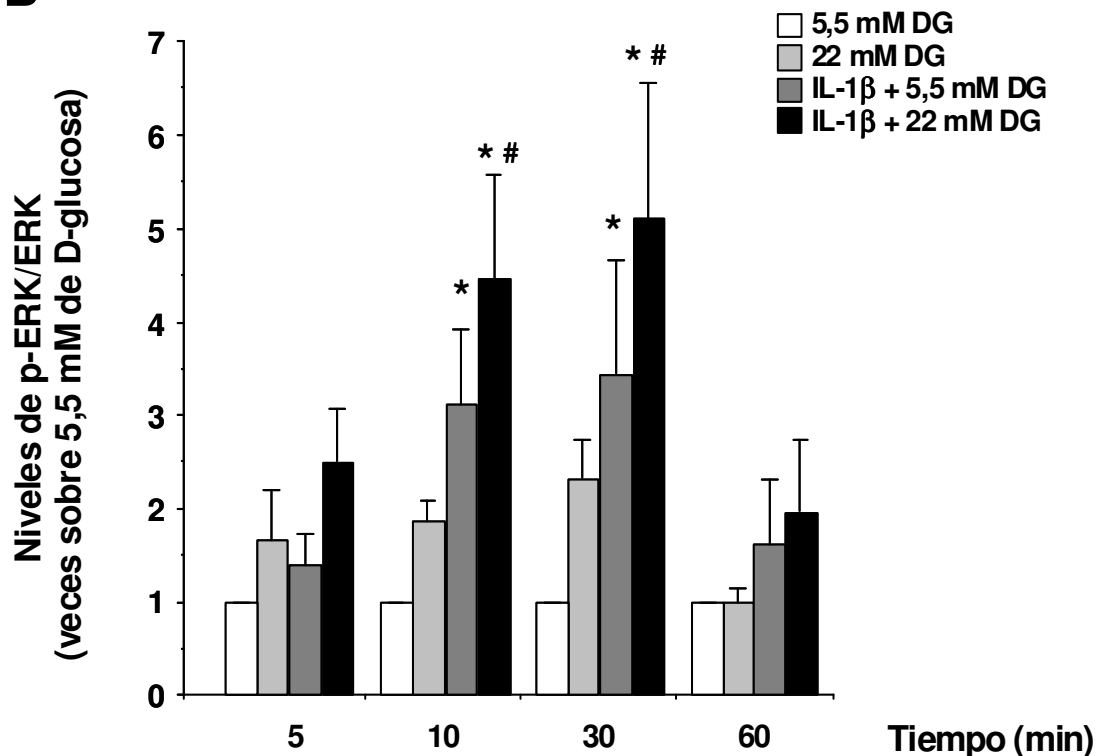
#### **Activación de ERK 1/2**

Para analizar la activación de la MAPK ERK 1/2 (p42/44) se cuantificó la forma fosforilada de ERK 1/2 (p-ERK 1/2) en relación a la cantidad total de ERK 1/2 mediante Western blot. Como en experimentos anteriores, las HUVEC se incubaron con IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) en presencia de 5,5 mM o de 22 mM de D-glucosa a diferentes tiempos (5 min a 60 min). En presencia de 5,5 mM de D-glucosa, la IL-1 $\beta$  aumentó los niveles de la forma activa de ERK1/2, siendo máxima la activación entre los 10 y 30 minutos y decayendo a los 60 min. En presencia de 22 mM de D-glucosa, el nivel de activación inducido por IL-1 $\beta$  observado a los 10 y 30 min se vio incrementado (figura 23).

A continuación, las HUVEC se incubaron con el inhibidor de la fosforilación de ERK 1/2, PD 98059 (30  $\mu$ M), 20 min antes del tratamiento habitual, para corroborar su acción sobre la activación de ERK 1/2. Se observó que el tratamiento con PD 98059



**Figura 22: Inmunolocalización de ICAM-1 y VCAM-1 en HUVEC.** Las HUVEC se incubaron con 5,5 mM ó 22 mM de D-glucosa en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) durante 18 h. Tras el tratamiento se visualizó **(A)** ICAM-1 y **(B)** VCAM-1 mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. 200x.

**A****B**

**Figura 23: Niveles de p-ERK 1/2.** Las HUVECs se incubaron con 5,5 mM ó 22 mM de D-glucosa con o sin IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) a diferentes tiempos (5 min – 60 min) **(A)** Ejemplo representativo de un Western blot. **(B)** Cuantificación de las bandas inmunorreactivas. El resultado se expresa como la media $\pm$ EEM de al menos cinco experimentos independientes. (\* $p$ <0,05 respecto de 5,5 mM D-glucosa;  $p$ <0,05 respecto de IL-1 $\beta$  + 5,5 mM de D-glucosa)

inhibió la fosforilación, y por tanto la activación de ERK 1/2, inducida por IL-1 $\beta$  en presencia de 5,5 y 22 mM de D-glucosa (figura 24)

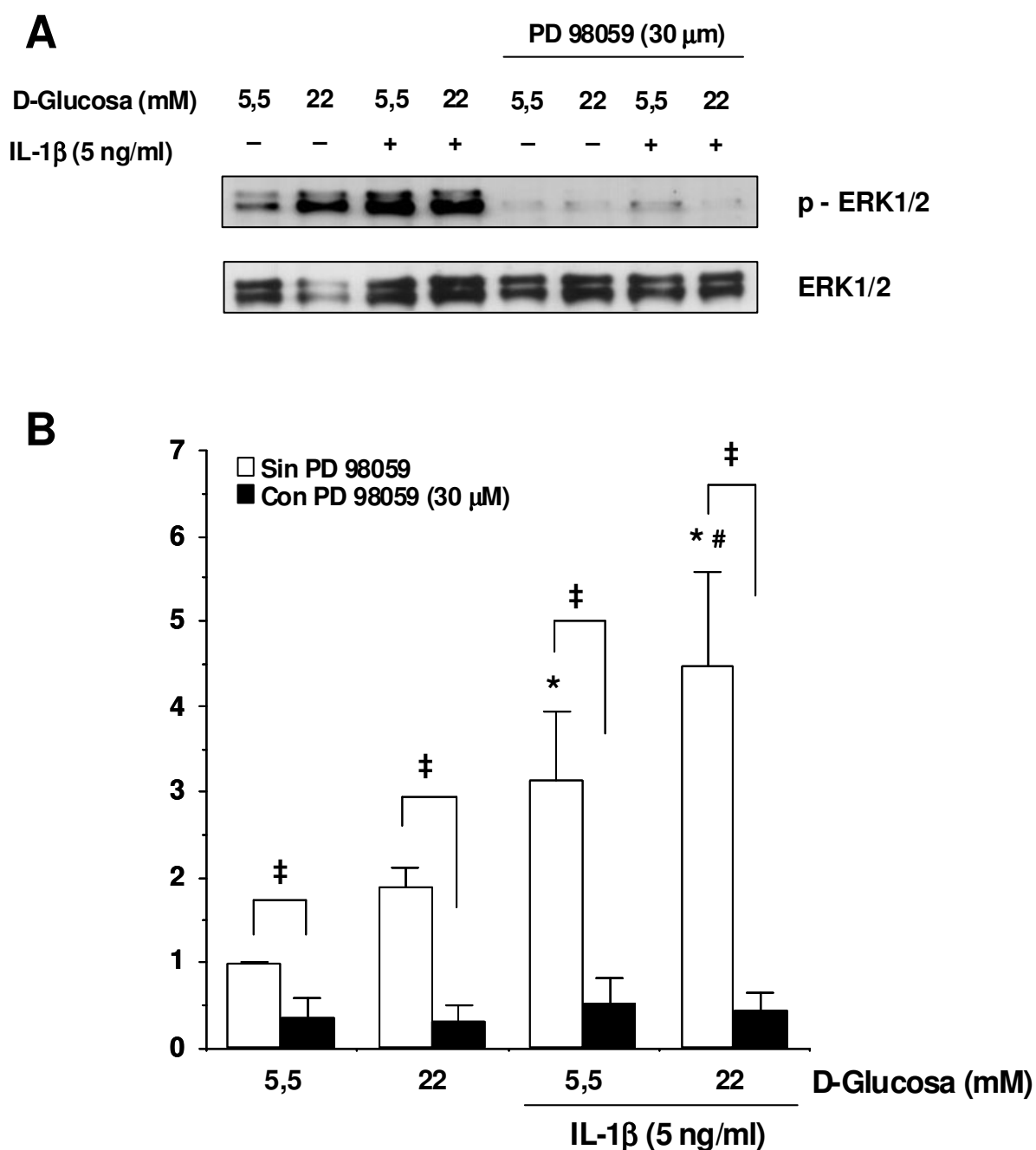
*PD 98059 inhibe la expresión de VCAM-1 pero no de ICAM-1 en HUVEC*

Para estudiar la posible implicación de ERK 1/2 (p42/p44) en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducida por IL-1 $\beta$ , se trataron las HUVEC con el inhibidor de ERK 1/2, PD 98059 (30  $\mu$ M), 20 min antes de la estimulación con IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) en un medio con 5,5 mM o con 22 mM de D-glucosa. PD 98059 abolió por completo la expresión de VCAM-1 inducida por IL-1 $\beta$ , tanto en un medio con 5,5 mM como con 22 mM de D-glucosa, sin modificar la expresión basal de VCAM-1 (figura 25B). Sin embargo, PD 98059 no disminuyó la expresión de ICAM-1 inducida por IL-1 $\beta$ , sino que aumentó significativamente su expresión, tanto en un medio con 5,5 mM como con 22 mM de D-glucosa. Además, PD 98059 por sí solo aumentó significativamente el nivel basal de ICAM-1 (figura 25A).

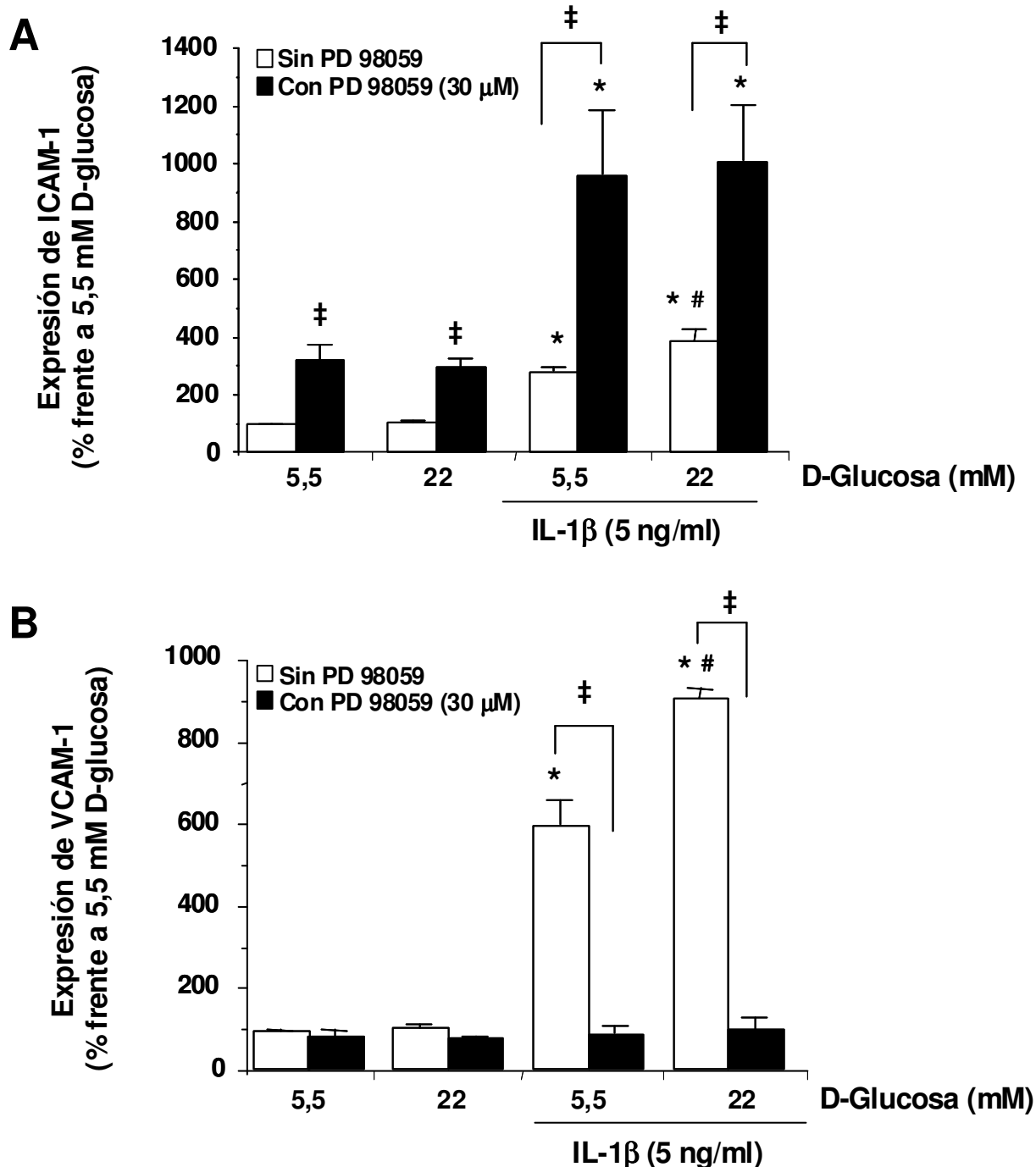
***Actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B***

*Ensayos de activación de NF- $\kappa$ B en HUVEC por retardo en gel (EMSA)*

Mediante ensayos de retardo en gel se analizó si el aumento de la concentración de D-glucosa en el medio era capaz de promover la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, implicado en procesos de carácter inflamatorio. Para ello, se trataron las HUVEC a diferentes tiempos (1, 4, 6 y 18 h) con 5,5 ó 22 mM de D-glucosa. El aumento de la concentración de D-glucosa no modificó los niveles de actividad de NF- $\kappa$ B a ninguno de



**Figura 24: PD 98059 inhibe la fosforilación de ERK 1/2.** Las HUVEC se incubaron con 5,5 mM ó 22 mM de D-glucosa en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) durante 10 min. En algunos casos, las HUVEC se incubaron 20 min antes del tratamiento con PD 98059 (30  $\mu$ M) **(A)** Ejemplo representativo de un Western blot. **(B)** Cuantificación de las bandas inmunorreactivas. El resultado se expresa como la media $\pm$ EEM de al menos tres experimentos independientes. (\* $p$ <0,05 respecto de 5,5 mM D-Glucosa; #  $p$ <0,05 respecto de IL-1 $\beta$ + 5,5 mM D-Glucosa; ‡  $p$ <0,05 respecto del mismo tratamiento sin PD 98059).



**Figura 25: Expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en ausencia o presencia de PD 98059.**

Las HUVEC se trataron con 5,5 mM ó 22 mM de D-glucosa con o sin IL-1β (5 ng/ml) durante 18 h. En algunos casos las HUVEC fueron pretratadas con PD 98059 (30 μM) durante 20 min. La cuantificación de la expresión de **(A)** ICAM-1 y **(B)** VCAM-1 se realizó por citometría de flujo. El resultado se expresa como la media±EEM de al menos tres experimentos independientes. (\* $p < 0,001$  respecto de 5,5 mM de D-glucosa, #  $p < 0,05$  respecto de IL-1β + 5,5 mM de D-glucosa, ‡  $p < 0,05$  respecto del mismo tratamiento sin PD 98059)



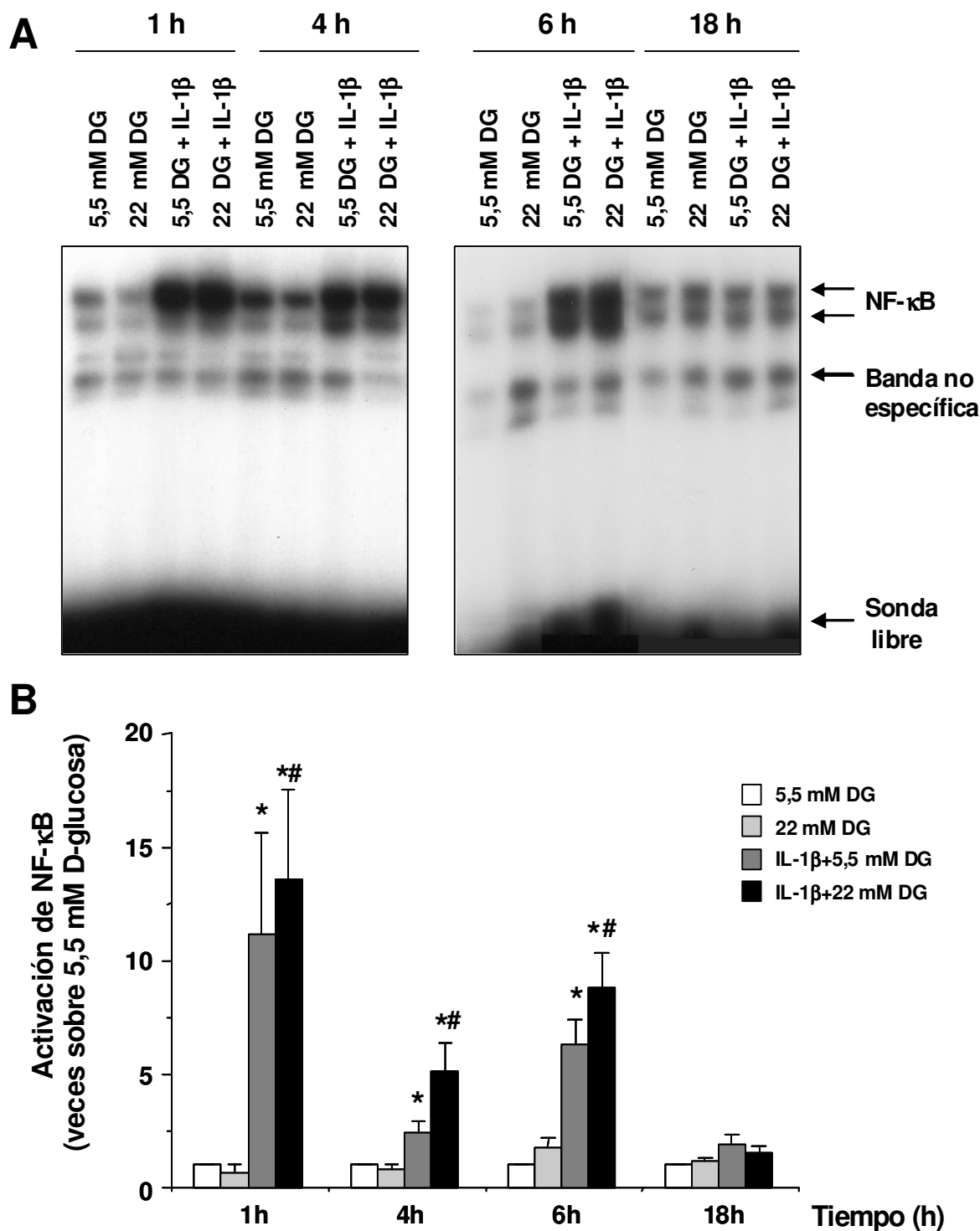
los tiempos estudiados (figura 26). Por otro lado, el tratamiento con IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) activó de manera rápida y muy marcada el NF- $\kappa$ B tras 1 h de tratamiento, activación que disminuyó a las 4 h y volvió a aumentar a las 6 h, con un perfil bifásico. Al cabo de 18 h de tratamiento con IL-1 $\beta$ , los niveles de NF- $\kappa$ B activado eran similares a los niveles basales (figura 26). Cuando las HUVEC fueron tratadas con IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) en presencia de 22 mM de D-glucosa la activación de NF- $\kappa$ B inducida por IL-1 $\beta$  fue significativamente mayor que la inducida por la citoquina en presencia de 5,5 mM de D-glucosa tanto a 1, 4 como a 6 h. A las 18 h del estímulo, la activación de NF- $\kappa$ B había regresado a los niveles basales en todos los casos (figura 26).

En otro grupo de experimentos, las HUVEC se incubaron con el agente antioxidante e inhibidor de NF- $\kappa$ B, ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC; 100  $\mu$ M) 20 min antes de la estimulación con IL-1 $\beta$  durante 1 ó 6 h, para comprobar la acción inhibidora de dicho compuesto. Se observó que el tratamiento con PDTC abolió por completo la activación de NF- $\kappa$ B inducida por IL-1 $\beta$  tanto en presencia de 5,5 como de 22 mM de D-glucosa a los dos tiempos estudiados (figura 27).

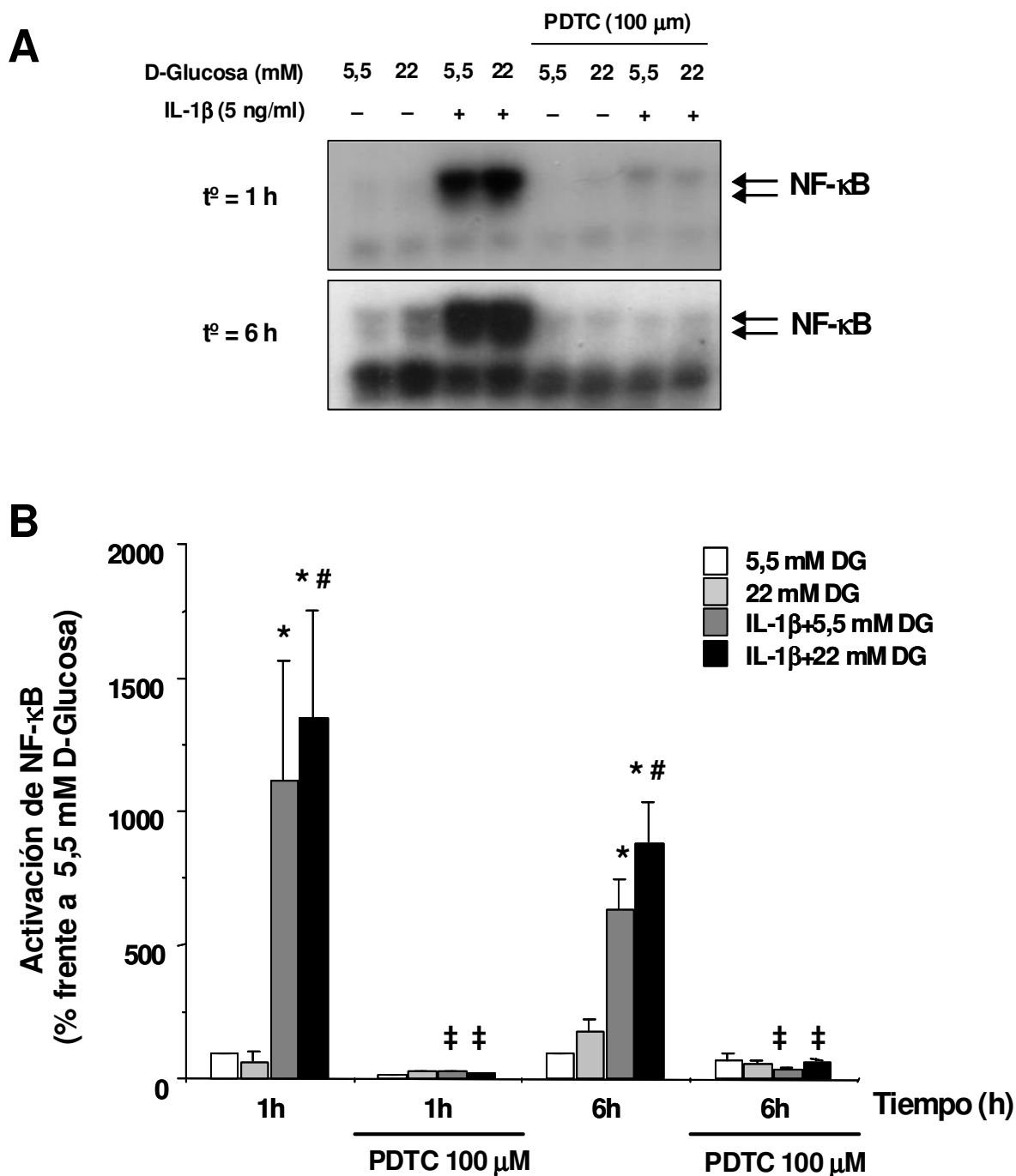
#### PDTC inhibe la expresión de VCAM-1 pero no de ICAM-1 en HUVEC

Con el fin de analizar el papel de NF- $\kappa$ B en la expresión de las CAMs, se analizó el posible efecto de PDTC sobre la respectiva expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducida por IL-1 $\beta$ . Para ello se añadió PDTC 20 min antes del tratamiento con IL-1 $\beta$  en presencia de 5,5 ó 22 mM de D-glucosa y posteriormente se cuantificó la expresión tanto de ICAM-1 como de VCAM-1 por citometría de flujo.

El resultado observado fue una completa abolición de la expresión de VCAM-1 inducida por IL-1 $\beta$  tanto en un medio con 5,5 mM como con 22 mM de D-glucosa (figura



**Figura 26: Activación de NF- $\kappa$ B.** Las HUVEC se incubaron con 5,5 mM ó 22 mM de D-glucosa en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) durante 1, 4, 6 y 18 h. **(A)** Ejemplo representativo de un gel de EMSA. **(B)** Cuantificación de las bandas radiactivas. El resultado se expresa como la media $\pm$ EEM de al menos tres experimentos independientes. (\* $p$ <0,05 respecto de 5,5 mM D-Glucosa; #  $p$ <0,05 respecto de IL-1 $\beta$ + 5,5 mM D-Glucosa).



**Figura 27: PDTC inhibe la activación de NF- $\kappa$ B.** Las HUVEC se incubaron con 5,5 mM ó 22 mM de D-glucosa en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) durante 1, y 6 h. En unos casos, las HUVEC se incubaron 20 min antes del tratamiento con PDTC 100  $\mu$ M (**A**) Ejemplo representativo de un EMSA. (**B**) Cuantificación de las bandas radiactivas. El resultado se expresa como la media $\pm$ EEM de al menos tres experimentos independientes. (\* $p < 0,05$  respecto de 5,5 mM D-Glucosa; #  $p < 0,05$  respecto de IL-1 $\beta$ + 5,5 mM D-Glucosa;  $\ddagger$   $p < 0,05$  respecto del mismo tratamiento sin PDTC).

28B). Sin embargo, el PDTC no fue capaz de reducir los niveles de expresión de ICAM-1 inducidos por IL-1 $\beta$  (figura 28A). El tratamiento con PDTC no alteró la expresión basal de ninguna de estas moléculas.

#### *Inmunolocalización de NF- $\kappa$ B en HUVEC*

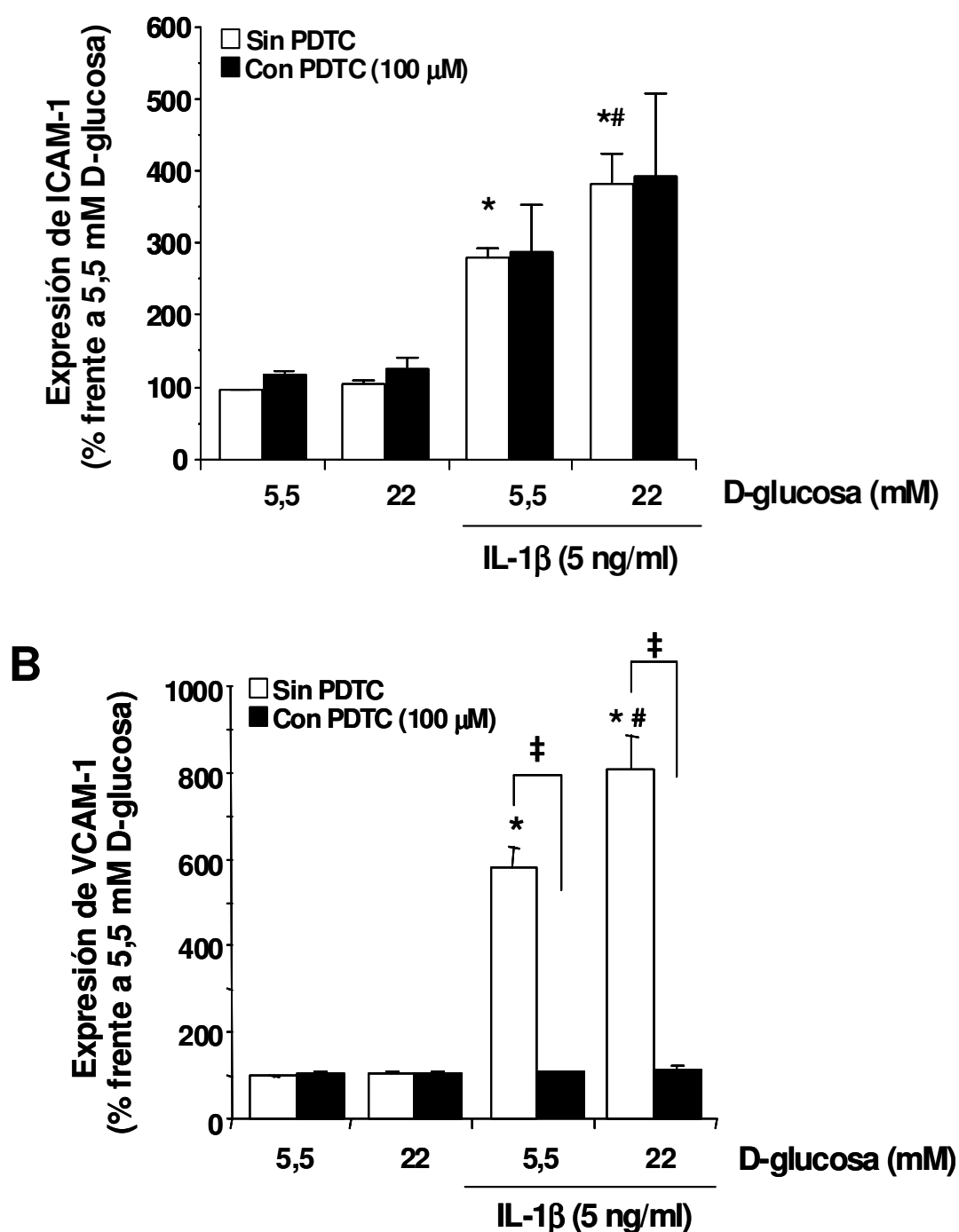
Las HUVEC se estimularon con IL-1 $\beta$  en un medio con 5,5 mM de D-glucosa durante 30 min, 1, 2 y 4 h, para establecer el tiempo de translocación de NF- $\kappa$ B desde el citosol hasta el núcleo en respuesta a esta citoquina. La tinción positiva en el interior del núcleo, correspondiente al NF- $\kappa$ B activado, se observó tras 1 h de tratamiento. Por tanto, se incubaron durante 1 h las HUVEC con IL-1 $\beta$  en un medio que contenía 5,5 mM ó 22 mM de D-glucosa. El simple aumento de la concentración de D-glucosa en el medio no modificó la traslocación de NF- $\kappa$ B al interior del núcleo, que sí se observó tras la administración de IL-1 $\beta$ , tanto en un medio con 5,5 mM como con 22 mM de D-glucosa (figura 29)

### **MODULACIÓN DE LA ENTRADA DE GLUCOSA AL INTERIOR CELULAR MEDIADA POR IL-1 $\beta$**

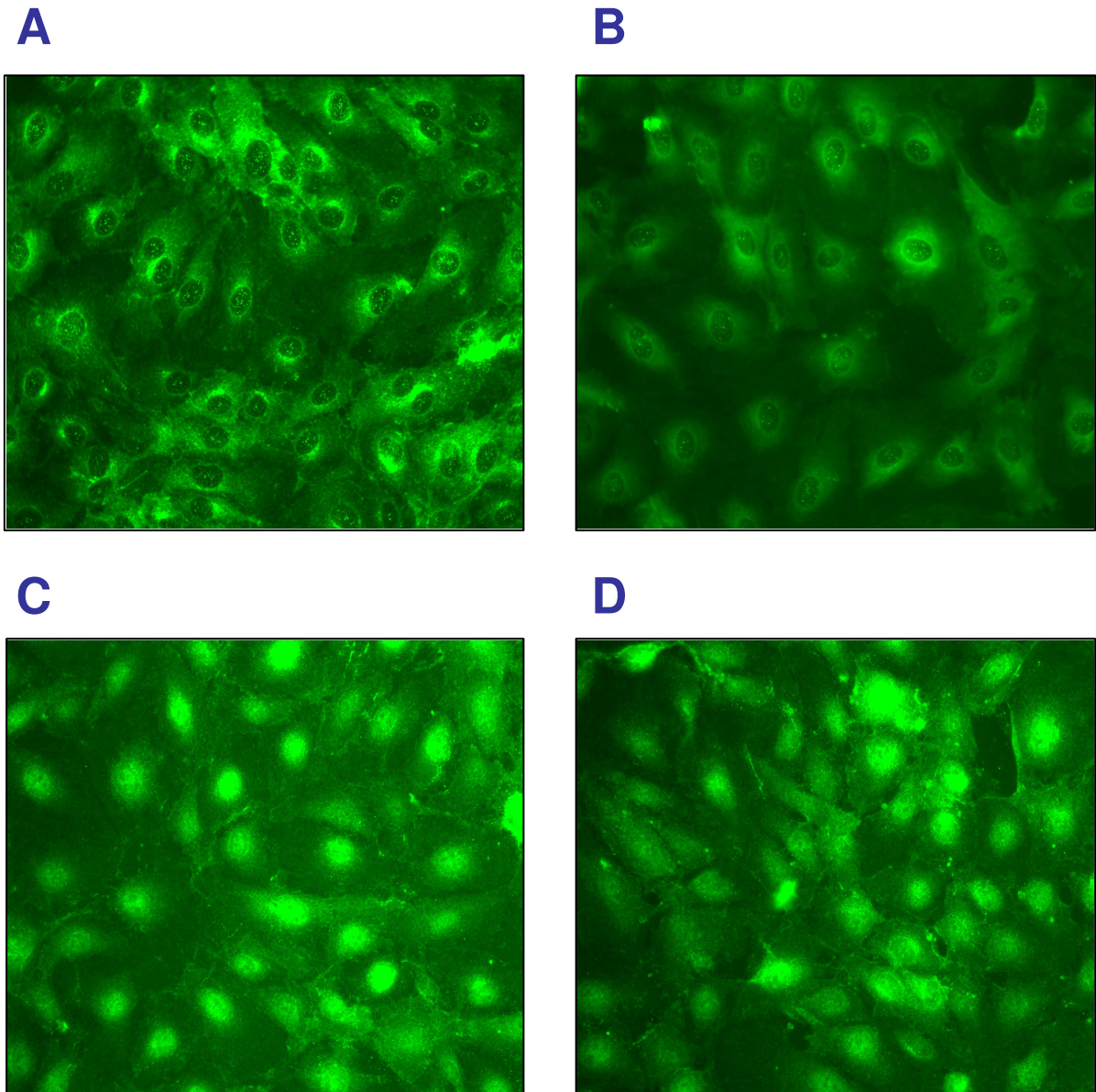
#### *Expresión del transportador de glucosa tipo 1 (GLUT-1) en HUVEC*

##### *Técnica de Western blot*

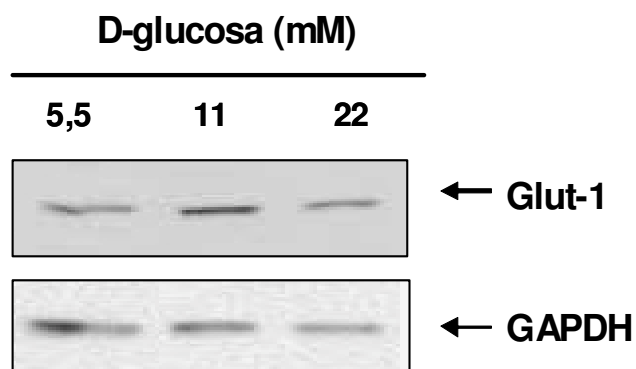
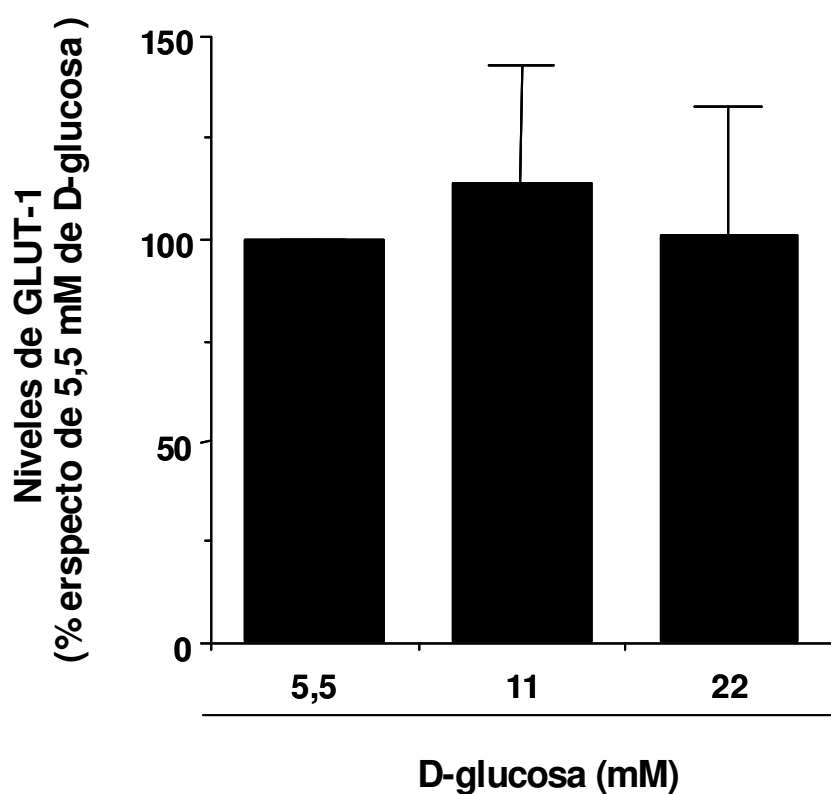
Se analizó la cantidad total de transportador de glucosa tipo 1 (GLUT-1) presente en las HUVEC mediante Western blot. Cuando se elevó la concentración de D-glucosa en



**Figura 28: Expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en presencia de PDTC.** Las HUVEC se trataron con 5,5 mM ó 22 mM de D-glucosa con o sin IL-1β (5 ng/ml) durante 18 h. En algunos casos las HUVEC fueron pretratadas con PDTC (100 μM) durante 20 min. La cuantificación de la expresión de **(A)** ICAM-1 y **(B)** VCAM-1 se realizó por citometría de flujo. El resultado se expresa como la media±EEM de al menos tres experimentos independientes. (\* $p < 0,001$  respecto de 5,5 mM de D-glucosa, #  $p < 0,05$  respecto de IL-1β + 5,5 mM de D-glucosa, ‡  $p < 0,05$  respecto del mismo tratamiento sin PDTC)



**Figura 29: Inmunolocalización de NF- $\kappa$ B en HUVEC.** Las HUVEC fueron incubadas con 5,5 mM ó 22 mM de D-glucosa con o sin IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) durante 1 h tras lo cual se visualizó el factor de transcripción NF- $\kappa$ B mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. **(A)** 5,5 mM D-Glucosa **(B)** 22 mM D-Glucosa **(C)** IL-1 $\beta$  5 ng/ml + 5,5 mM D-Glucosa y **(D)** IL-1 $\beta$  5 ng/ml + 22mM D-glucosa. Cuando no está activado, el NF- $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma (A y B). Al ser activado por un estímulo apropiado, el NF- $\kappa$ B se trasloca al núcleo para unirse a la secuencia consenso en el ADN (C y D). 400x.

**A****B**

**Figura 30: Niveles de GLUT-1.** Las HUVEC se incubaron con concentraciones crecientes de D-glucosa (5,5 - 22 mM) durante 18 h y se cuantificó GLUT-1 mediante Western blot. **(A)** Ejemplo representativo de un gel de Western blot. **(B)** Cuantificación de las bandas inmunorreactivas. El resultado se expresa como la media $\pm$ EEM de al menos tres experimentos independientes.

el medio (de 5,5 mM a 11 ó 22 mM) durante 18 h no se observaron modificaciones en los niveles de GLUT-1 (figura 30). Cuando las HUVEC se trataron con concentraciones crecientes de IL-1 $\beta$  (0,1 a 10 ng/ml) durante 18 h, se produjo un aumento significativo de los niveles de GLUT-1 en función de la concentración, con un efecto submáximo a 5 ng/ml, concentración empleada en los siguientes experimentos (figura 31). Finalmente, cuando las HUVEC se incubaron con IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) en presencia de 22 mM de D-glucosa, los niveles de GLUT-1 fueron mayores que los inducidos por IL-1 $\beta$  en un medio con 5,5 mM de D-glucosa (figura 32).

#### Técnica de citometría de flujo

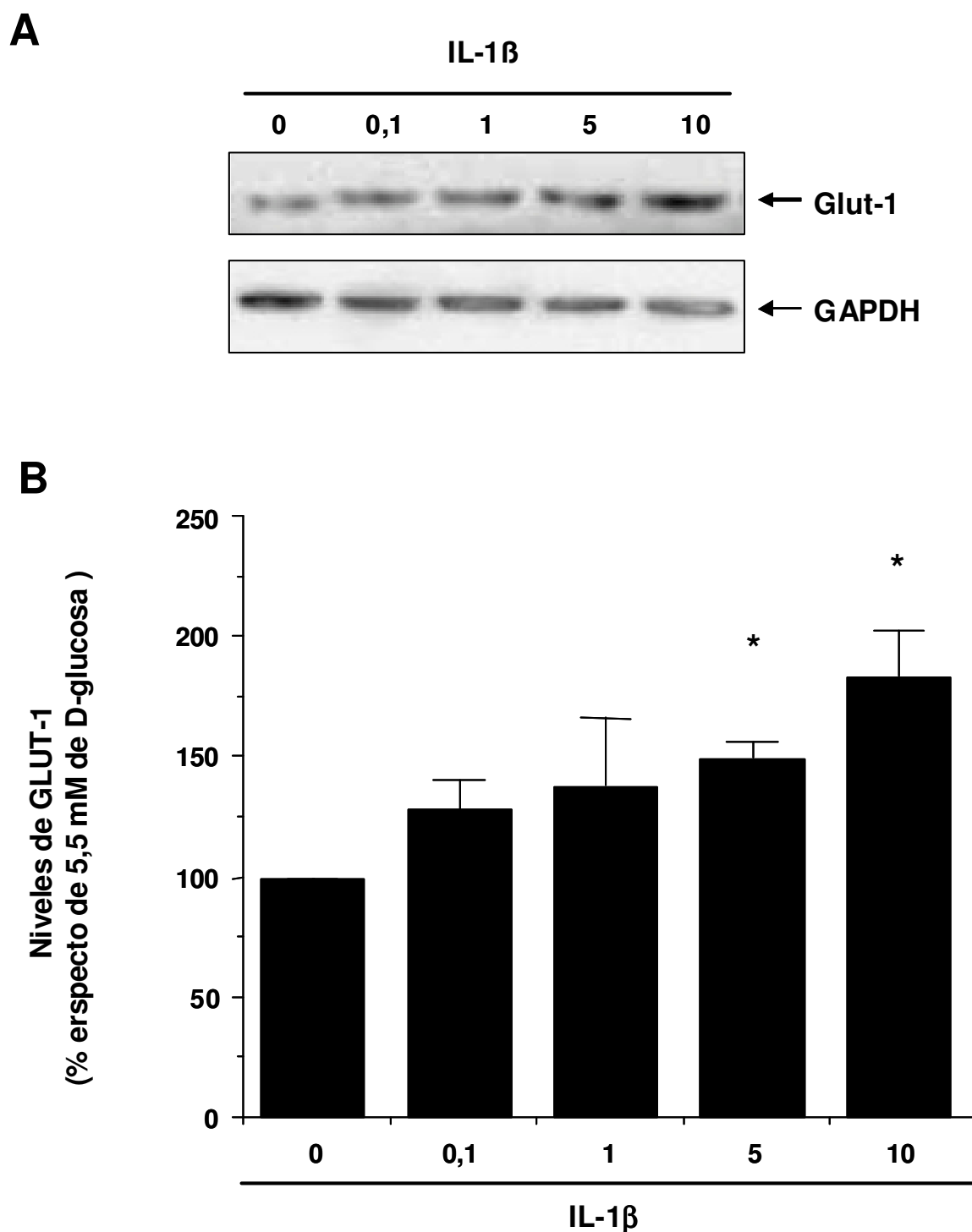
La expresión de GLUT-1 en la superficie celular se evaluó mediante citometría de flujo, siguiendo un protocolo análogo al descrito en el anterior apartado.

Con esta técnica, la elevación de la glucosa de 5,5 mM a 22 mM provocó una tendencia a disminuir la expresión de GLUT-1 en la superficie celular (figura 33). Por su parte, el tratamiento con IL-1 $\beta$  produjo un aumento significativo de la expresión del transportador GLUT-1 en la superficie celular, que se incrementó en presencia de un medio con 22 mM de D-glucosa (figura 33).

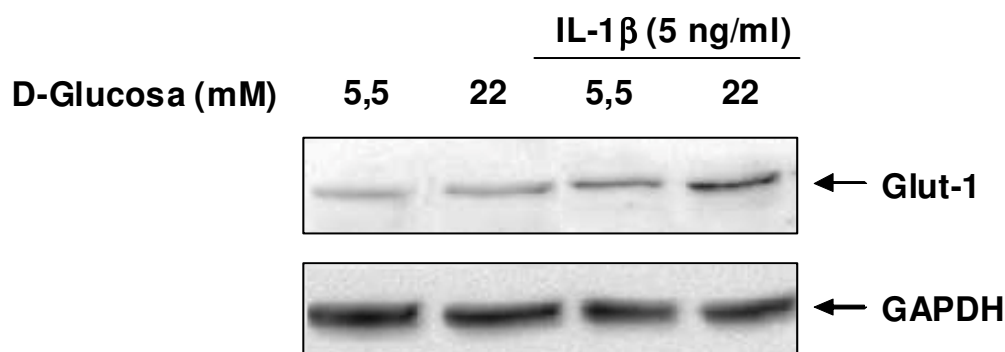
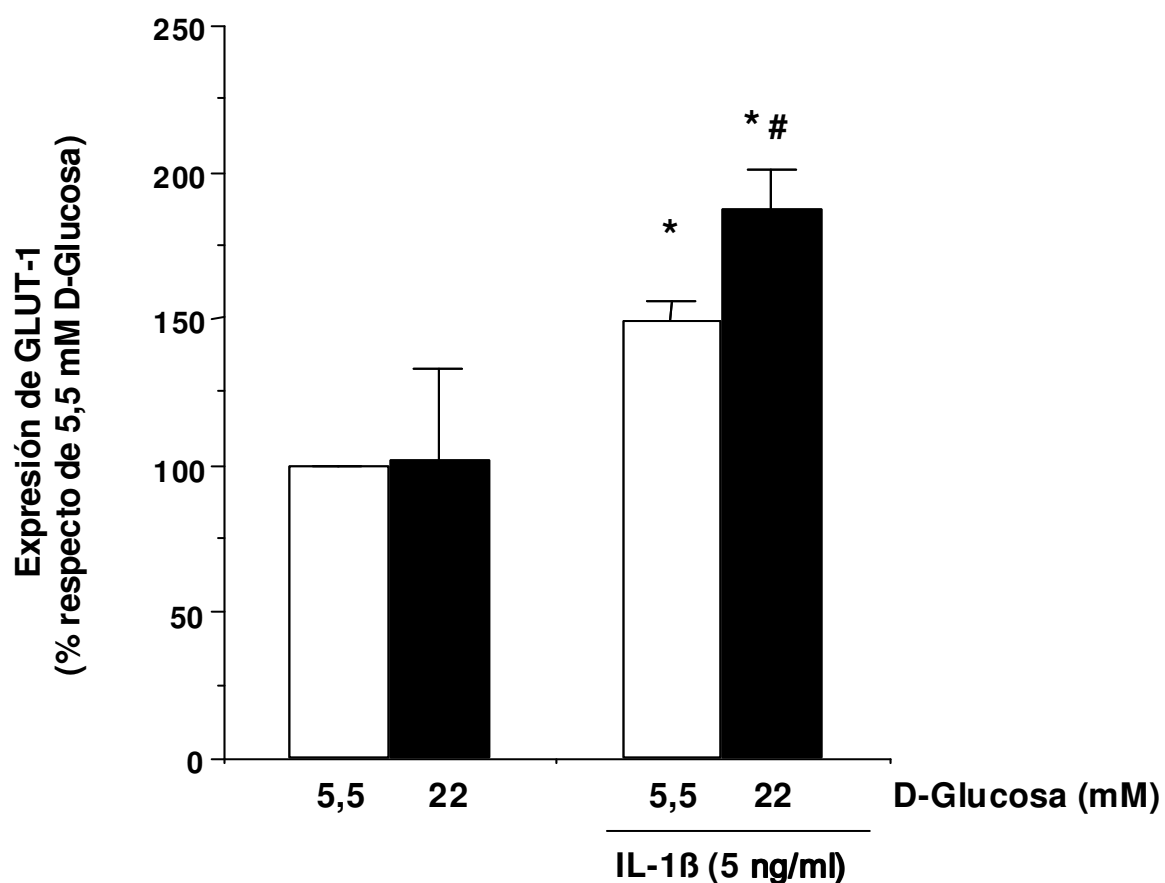
#### Técnica de inmunolocalización

Por último, la expresión de GLUT-1 en la membrana celular se visualizó mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta, utilizando un anticuerpo específico frente al dominio N-terminal del transportador. Con esta técnica, el mero incremento de la concentración de D-glucosa no modificó la expresión de GLUT-1 en la superficie celular, mientras que la IL-1 $\beta$  aumentó la expresión del transportador tanto en un medio con 5,5, mM como con 22 mM de D-glucosa (figura 34).

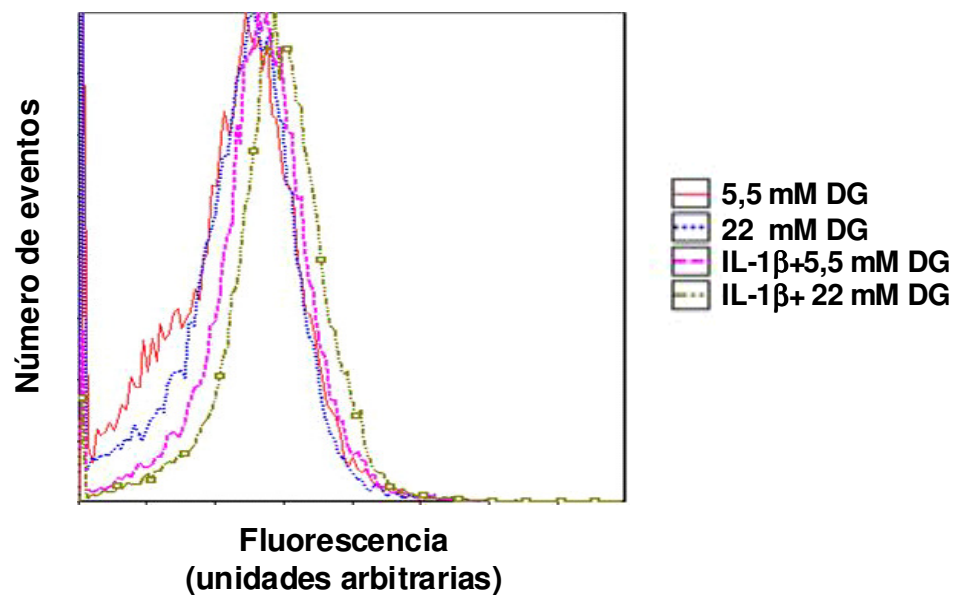
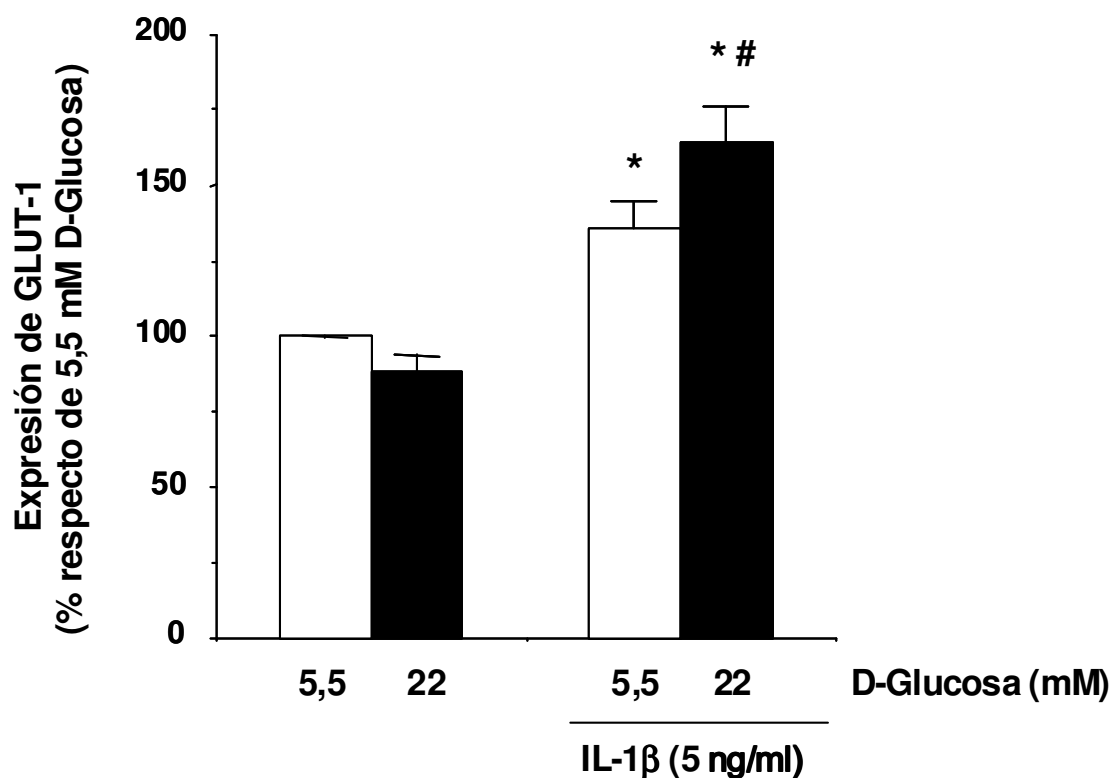




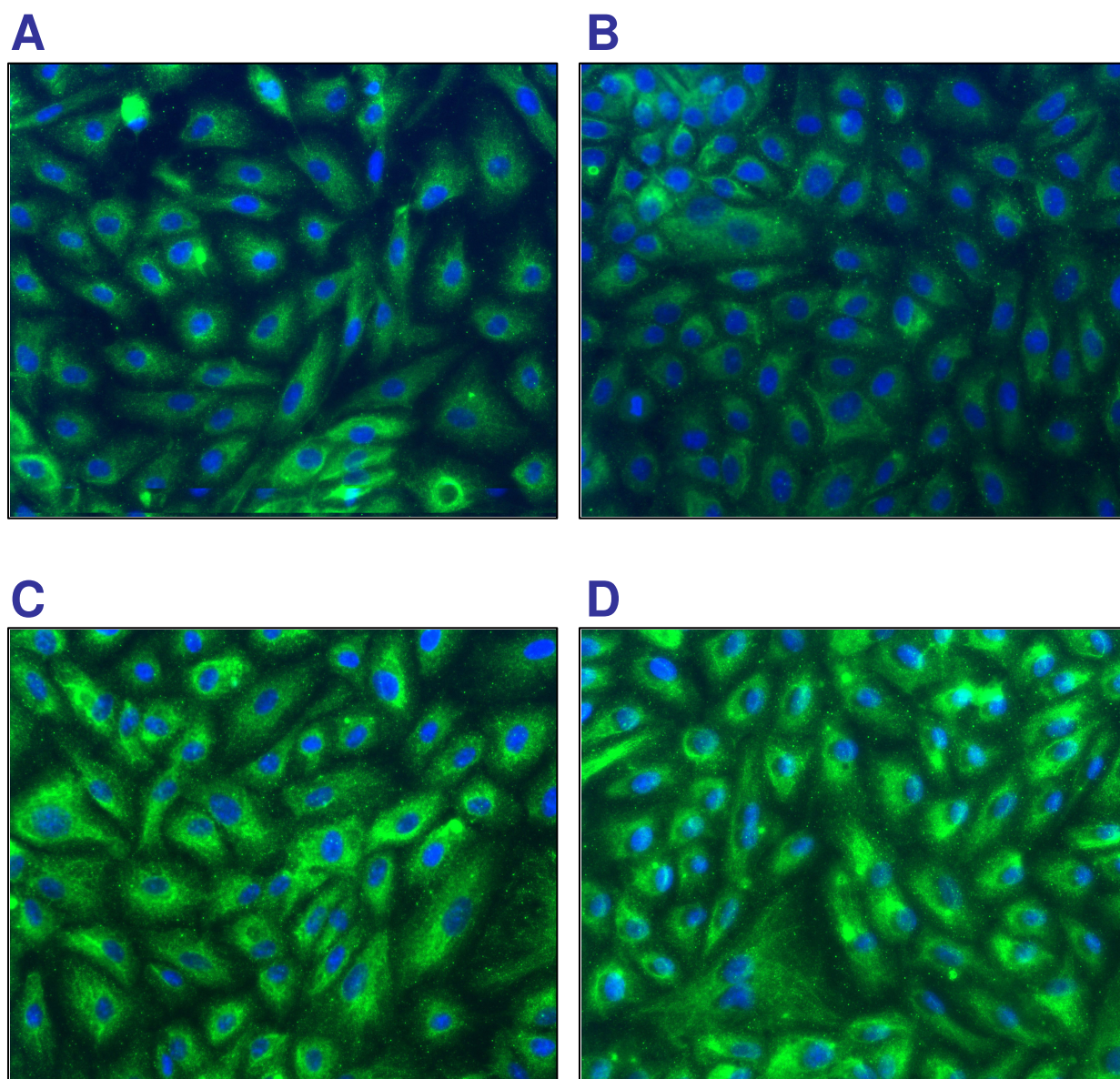
**Figura 31: Niveles de GLUT-1.** Las células se incubaron con concentraciones crecientes de IL-1 $\beta$  (0,1 - 10 ng/ml) en 5,5 mM de D-glucosa durante 18 h y se cuantificó GLUT-1 mediante Western blot. **(A)** Ejemplo representativo de un gel de Western blot. **(B)** Cuantificación de las bandas inmunorreactivas. El resultado se expresa como la media $\pm$ EEM de al menos cinco experimentos independientes. (\* $p$ <0,05 respecto de 5,5 mM D-Glucosa)

**A****B**

**Figura 32: Niveles de GLUT-1.** Las HUVEC se incubaron con 5,5 mM ó 22 mM de D-glucosa en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) durante 18 h y se cuantificó GLUT-1 mediante Western blot. **(A)** Ejemplo representativo de un gel de Western blot. **(B)** Cuantificación de las bandas inmunorreactivas. El resultado se expresa como la media $\pm$ EEM de al menos tres experimentos independientes. (\*  $p<0,05$  respecto de 5,5 mM de D-glucosa; #  $p<0,05$  respecto de IL-1 $\beta$  + 5,5 mM de D-glucosa)

**A****B**

**Figura 33: Expresión de GLUT-1.** Las HUVEC se incubaron con 5,5 mM ó 22 mM de D-glucosa (DG) en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) durante 18 h y se cuantificó la expresión de GLUT-1 mediante citometría de flujo. **(A)** Histograma representativo. **(B)** Cuantificación de GLUT-1. El resultado se expresa como la media $\pm$ EEM de al menos cinco experimentos independientes. (\* $p < 0,05$  respecto de 5,5 mM D-Glucosa)



**Figura 34: Inmunolocalización de GLUT-1 en HUVEC.** Las HUVEC fueron incubadas con 5,5 mM ó 22 mM de D-glucosa con o sin IL-1 $\beta$  durante 18 h. Tras el tratamiento se visualizó el transportador de glucosa, GLUT-1, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. **(A)** 5,5 mM D-Glucosa **(B)** 22 mM D-Glucosa **(C)** IL-1 $\beta$  5 ng/ml + 5,5 mM D-Glucosa y **(D)** IL-1 $\beta$  5 ng/ml + 22mM D-glucosa. 400x.

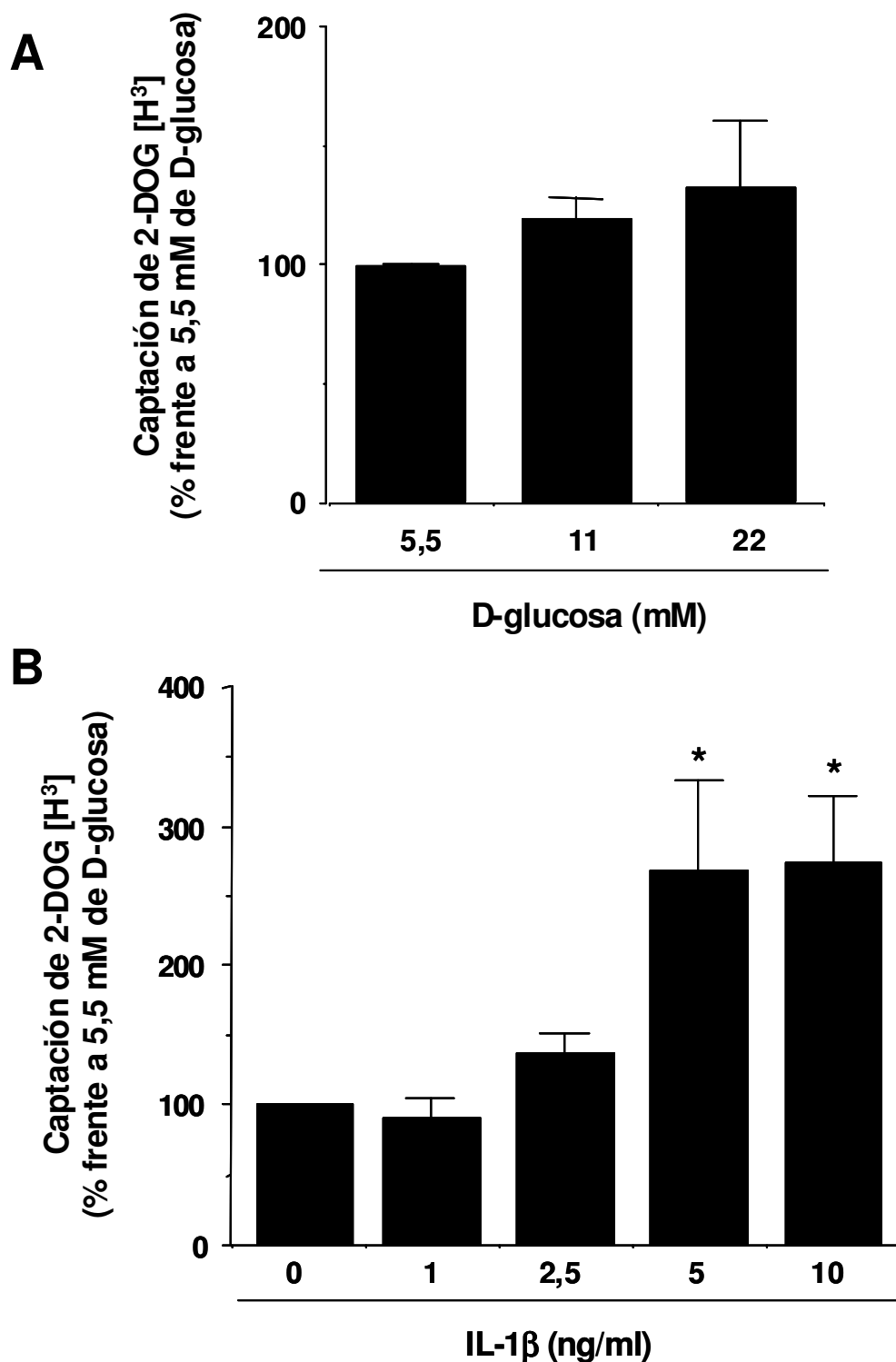
***Captación de [H<sup>3</sup>]-2-deoxiglucosa en HUVEC***

La capacidad de las células para incorporar D-glucosa se realizó mediante el ensayo de captación de [H<sup>3</sup>]-2-deoxiglucosa ([H<sup>3</sup>]-2-DOG), un análogo radiactivo y no metabolizable de la D-glucosa. Inicialmente, las HUVEC se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de D-glucosa (5,5, 11 y 22 mM) durante 18 h. Tras 10 min de incubación con 0,1 µCi/ml de [H<sup>3</sup>]2-DOG, se midió la cantidad de tritio captado, sin que se observaran diferencias significativas a ninguna de las concentraciones utilizadas (figura 35A).

Posteriormente, las HUVEC se trataron durante 18 h con concentraciones crecientes de IL-1β (1 a 10 ng/ml) en presencia de 5,5 mM de D-glucosa. Tras finalizar este periodo de incubación, las HUVEC se incubaron durante 10 min con 0,1 µCi/ml de [H<sup>3</sup>]2-DOG. La cantidad de tritio en el interior celular aumentó de manera proporcional a la concentración de IL-1β empleada, observándose el efecto máximo a 5 ng/ml (figura 35B).

**ESTUDIOS DE ADHESIÓN LEUCOCITARIA*****Adhesión in vitro de leucocitos a las HUVEC bajo condiciones de flujo.***

Se realizaron estudios funcionales *in vitro*, utilizando la técnica de cámara de flujo para investigar si el sinergismo entre la D-glucosa y la IL-1β observado en la expresión de las moléculas de adhesión se traducía en una mayor adhesión de los leucocitos HL-60 perfundidos sobre una monocapa de células endoteliales. Para ello se trataron las HUVEC durante 18 h con IL-1β (5 ng/ml) en presencia de 5,5 ó 22 mM de D-glucosa.



**Figura 35: Captación de [H<sup>3</sup>]2-DOG.** Las HUVEC se incubaron 18 h con concentraciones crecientes de **(A)** D-glucosa (5,5 - 22 mM) y de **(B)** IL-1 $\beta$  (1 - 10 ng/ml) en presencia de 5,5 mM de D-glucosa, y se midió la cantidad de [H<sup>3</sup>]2-DOG captada por las HUVEC. El resultado se expresa como la media $\pm$ EEM de al menos cinco experimentos independientes (\* $p$ <0,05 respecto de 5,5 mM de D-glucosa).

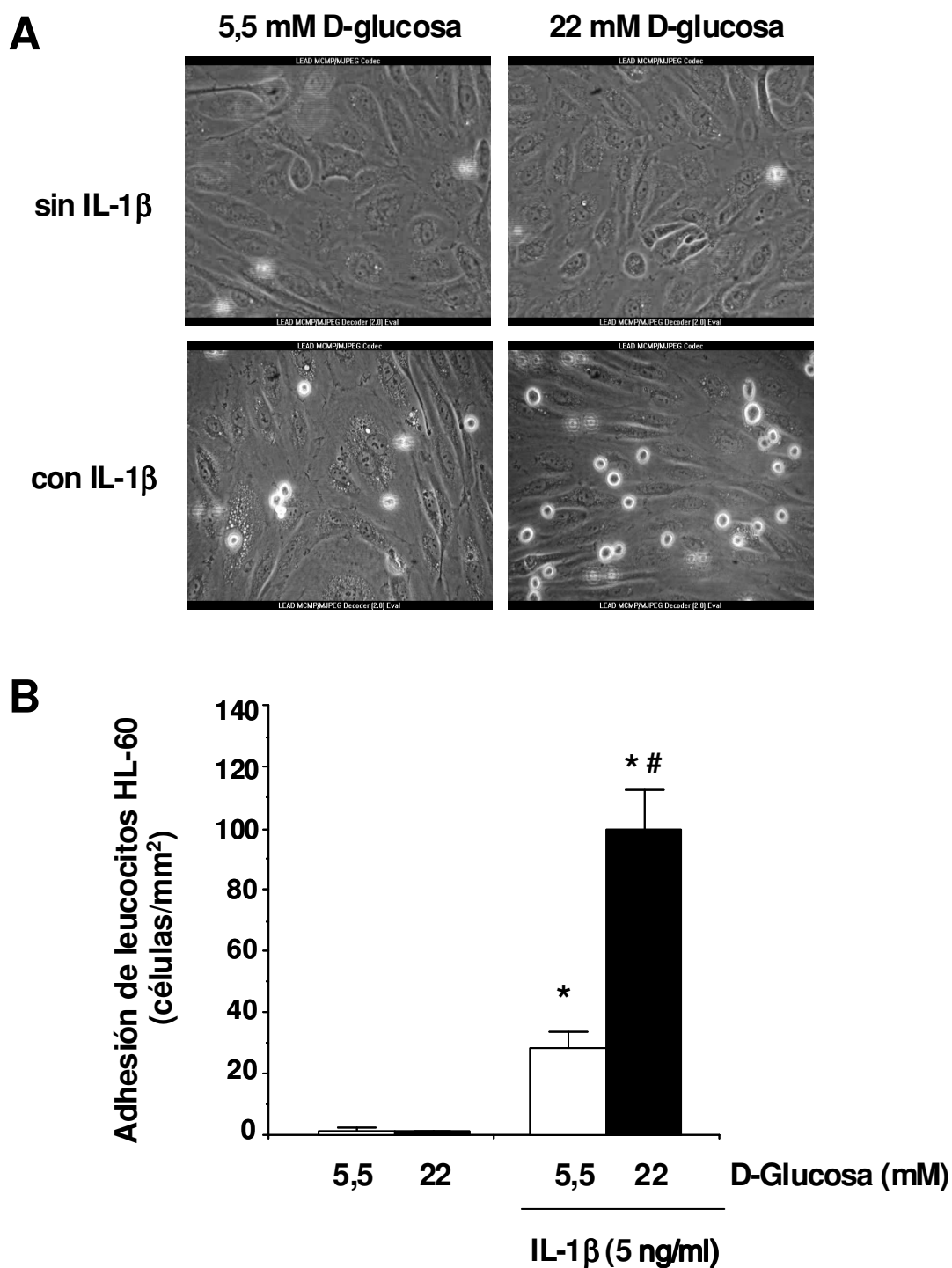
En condiciones basales se detectó un nivel muy bajo de leucocitos HL-60 adheridos a la capa endotelial ( $2,87 \pm 1,84$  células/mm<sup>2</sup>). Cuando la concentración de D-glucosa en el medio se incrementó hasta 22 mM durante 18 h, no se observaron diferencias significativas frente a 5,5 mM de D-glucosa. Por su parte, el tratamiento de las HUVEC con IL-1 $\beta$  incrementó significativamente el número de leucocitos HL-60 adheridos. La administración de IL-1 $\beta$  en un medio con 22 mM de D-glucosa, produjo un efecto sinérgico en la adhesión leucocitaria, análogo al descrito anteriormente en los experimentos de expresión de CAMs (figura 36).

#### ***Ensayos de la adhesión y tráfico leucocitario in vivo mediante microscopía intravital.***

Para correlacionar los resultados obtenidos *in vitro* con un modelo *in vivo* más complejo, se examinó mediante microscopía intravital el tráfico leucocitario en la microvasculatura mesentérica de ratas Sprague-Dawley. En este caso, el protocolo experimental incluía la inyección intraperitoneal de un estímulo inflamatorio (un bolo de 200 ng/kg de IL-1 $\beta$ ), una inyección de D-glucosa (40 mg/kg) o ambos en combinación. Como controles se administró un volumen idéntico de solución salina o una cantidad equivalente de L-glucosa, como control osmótico.

Transcurridas 18 h y antes de comenzar los experimentos, se midieron distintos parámetros hemodinámicos para comprobar que las posibles variaciones observadas en el tráfico de leucocitos no se debieron a cambios en los mismos (Tabla 1).

Cuando en estos animales se estudió en vénulas mesentéricas el tráfico leucocitario mediante microscopía intravital, se observó que en aquellos animales que recibieron únicamente 40 mg/kg de D-glucosa, no se produjeron cambios significativos en la adhesión leucocitaria. Tampoco se observaron cambios en el flujo y la migración de



**Figura 36: Adhesión de leucocitos HL-60 a las HUVEC bajo condiciones de flujo laminar.** Las monocapas de HUVEC fueron expuestas a 5,5 mM ó 22 mM de D-glucosa en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) 18 h antes de la perfusión de los leucocitos HL-60. **(A)** Micrografías representativas de la adhesión de las HL-60 a la monocapa endotelial. **(B)** Cuantificación del número de células adheridas por mm<sup>2</sup>. Las barras representan la media  $\pm$ EEM de al menos tres experimentos independientes (\*  $p < 0,05$  respecto de 5,5 mM de D-glucosa; #  $p < 0,05$  respecto de IL-1 $\beta$  + 5,5 mM de D-glucosa).



	MABP (mm Hg)	Rozamiento en arteriolas ( $s^{-1}$ )	Rozamiento en vénulas ( $s^{-1}$ )
Salino	$108,8 \pm 2,6$	$1929,7 \pm 559,3$	$525,4 \pm 42,7$
L-glucosa	$114,6 \pm 4,0$	$1881,7 \pm 280,5$	$469,5 \pm 50,4$
D-glucosa	$112,6 \pm 3,9$	$1303,2 \pm 272,7$	$493,9 \pm 50,0$
IL-1 $\beta$	$113,4 \pm 4,6$	$1969,7 \pm 351,5$	$502,8 \pm 27,0$
LG + IL-1 $\beta$	$108,8 \pm 5,5$	$1676,5 \pm 207,0$	$500,8 \pm 39,2$
DG + IL-1 $\beta$	$115,3 \pm 3,9$	$1658,9 \pm 299,8$	$477,5 \pm 66,9$

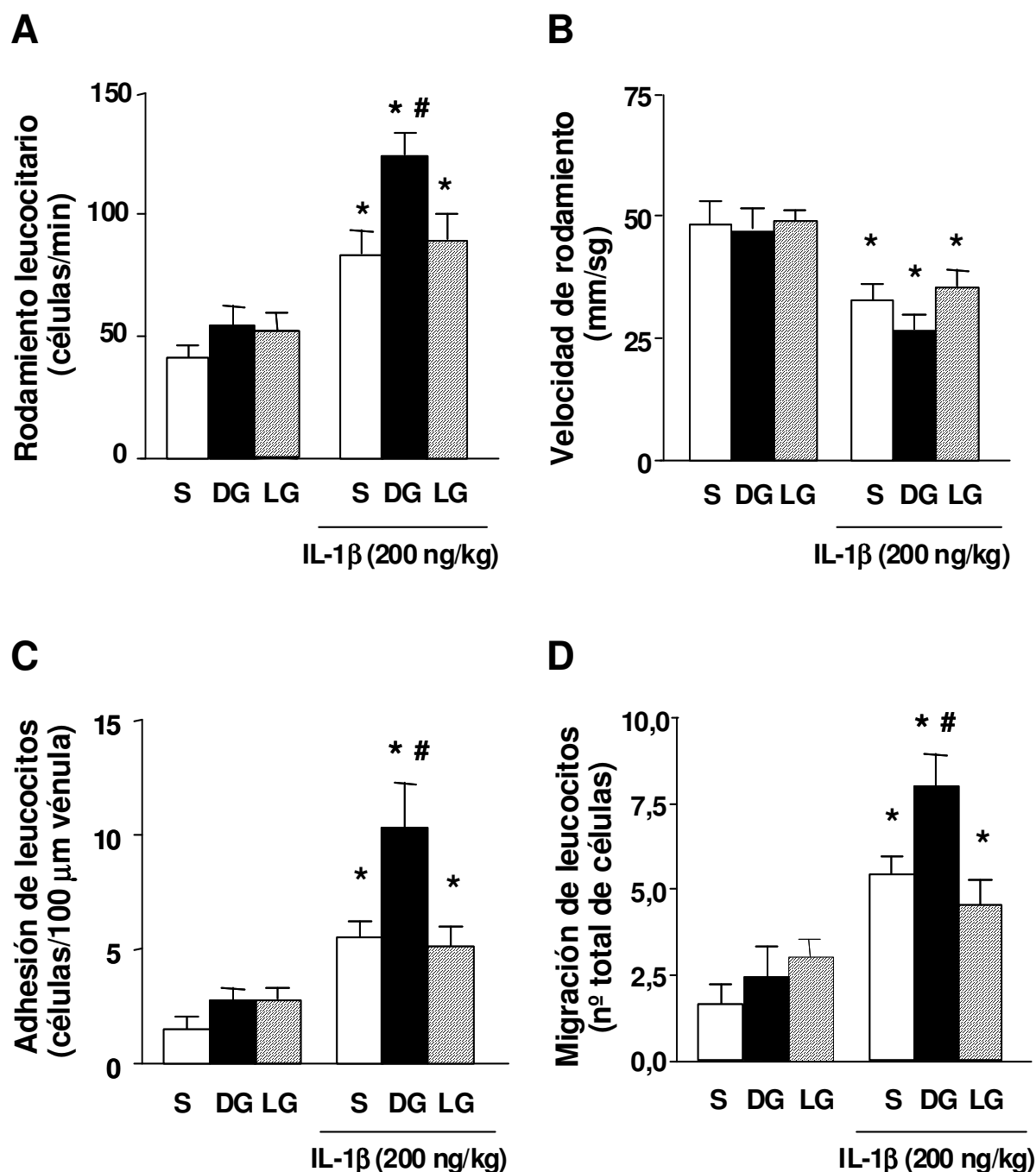
**Tabla 1:** Parámetros hemodinámicos de ratas SD, 18 h después de la administración del tratamiento.

leucocitos a través de la pared endotelial, ni en la velocidad de rodamiento de los leucocitos (figura 37).

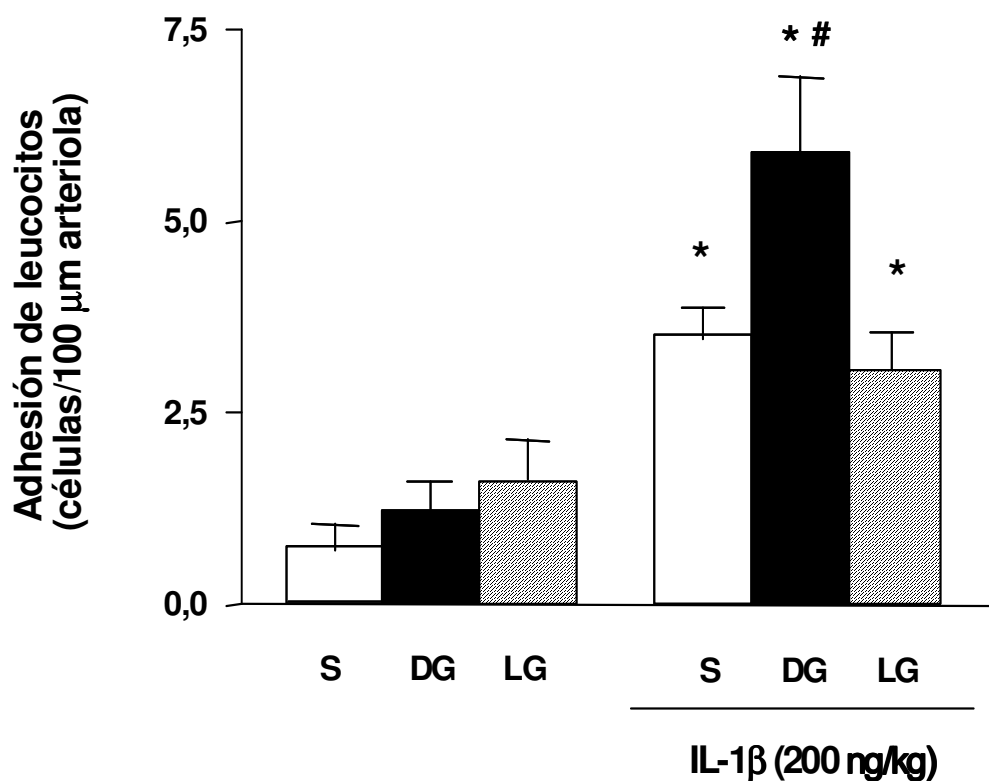
Sin embargo, en los animales tratados con IL-1 $\beta$  se observó un aumento significativo en el flujo venular de leucocitos en fase de rodamiento junto con una disminución de la velocidad de estos leucocitos en comparación con los animales controles (figura 37A y 37B). Igualmente, se observó un incremento en el número de leucocitos adheridos a la pared vascular así como un mayor número de leucocitos migrados al espacio subendotelial (figura 37C y 37D).

Finalmente, cuando el estímulo inflamatorio (IL-1 $\beta$ ) y la glucosa se administraron al mismo tiempo, se observó un claro efecto sinérgico en todos los parámetros de tráfico leucocitario evaluados respecto de lo observado por la mera administración de IL-1 $\beta$  (figura 37). Este efecto no se debió a la alteración de la osmolaridad, ya que la L-glucosa no mimetizó el efecto de la D-glucosa (figura 37).

Por otra parte, se analizó también la adhesión de leucocitos en arteriolas mesentéricas que fue análoga a la observada en vénulas. No se observó ninguna alteración en ratas tratadas con 40 mg/kg de D-glucosa, mientras que la IL-1 $\beta$  incrementó significativamente la adhesión leucocitaria. La administración conjunta de IL-1 $\beta$  y 40 mg/kg de D-glucosa resultó en un marcado efecto sinérgico que no se debió a la hiperosmolaridad, ya que la L-glucosa no reprodujo dicho efecto (figura 38).



**Figura 37: Análisis del tráfico leucocitario en vénulas postcapilares de ratas SD.** A las ratas se les administró salino (S), D-glucosa (DG) y L-glucosa (LG) (40 mg/Kg) con o sin IL-1β (200 ng/Kg). 18 h después de la administración del tratamiento, se analizó mediante microscopía intravital, **(A)** el número de leucocitos en fase de rodamiento **(B)** La velocidad de los leucocitos en rodamiento, **(C)** el número de leucocitos adheridos a la pared del vaso y **(D)** el número de leucocitos migrados al espacio subendotelial. El resultado se expresa como la media±EEM de al menos cinco experimentos independientes. (\*  $p < 0,05$  respecto del salino; #  $p < 0,05$  respecto de IL-1β)

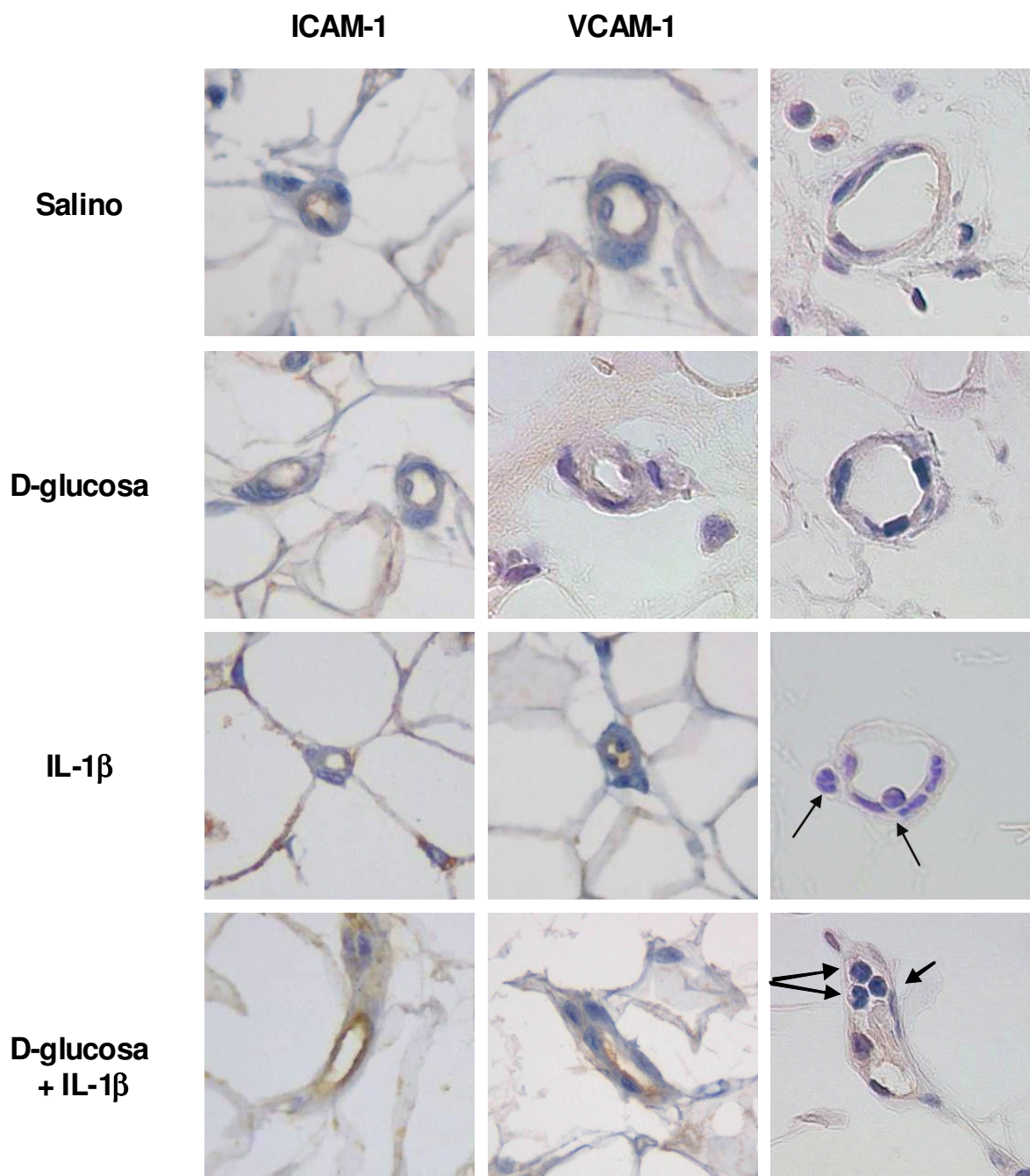


**Figura 38: Análisis de la adhesión leucocitaria en arteriolas de ratas SD.** Se administró a los animales salino (S), D-glucosa (DG) y L-glucosa (LG) (40 mg/Kg) con o sin IL-1 $\beta$  (200 ng/Kg). el número de leucocitos adheridos a la pared del vaso se analizó mediante microscopía intravital, 18 h después de la administración del tratamiento. El resultado se expresa como la media $\pm$ EEM de al menos cinco experimentos independientes. (\*  $p < 0,05$  respecto del salino; #  $p < 0,05$  respecto de IL-1 $\beta$ )

*Inmunolocalización de ICAM-1 y VCAM-1 en el tejido mesentérico*

Con el fin de visualizar la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, así como los leucocitos adheridos a la pared vascular de las vénulas mesentéricas de ratas SD tratadas con los protocolos descritos, se realizaron estudios histológicos e inmunohistoquímicos del tejido mesentérico.

En animales controles o en aquellos que recibieron 40 mg/kg de D-glucosa, se observó una leve tinción basal de ICAM-1 pero no de VCAM-1. Asimismo, no se observó ningún leucocito adherido o migrado al espacio subendotelial en estos animales (figura 39). Sin embargo, el tejido que provenía de las ratas tratadas con IL-1 $\beta$  mostró una tinción positiva tanto de ICAM-1 como de VCAM-1, al mismo tiempo que se pudo apreciar la adhesión y la migración de leucocitos a través de la pared vascular. Estos efectos fueron exacerbados en animales que recibieron el tratamiento combinado de IL-1 $\beta$  y D-glucosa (figura 39).



**Figura 39: Inmunolocalización de ICAM-1, VCAM-1 y leucocitos transmigrados en vénulas postcapilares del tejido mesentérico de ratas SD.** Se administró a los animales una inyección de salino, D-glucosa (40 mg/kg), IL-1 $\beta$  (200 ng/kg) o D-glucosa e IL-1 $\beta$  conjuntamente. El producto de la reacción de la peroxidasa se observa en color marrón e indica una tinción positiva para ICAM-1 (columna izquierda) y VCAM-1 (columna central) en el endotelio vascular. Los leucocitos migrados al espacio subendotelial están señalados por flechas en la columna derecha. Todas las fotografías están contrateñidas con hematoxilina. Microfotografías representativas de cinco experimentos para cada tratamiento. 400x.

## ***Discusión***

***Expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1. Adhesión y tráfico leucocitario al endotelio tras la elevación de la concentración de D-glucosa.***

Las enfermedades cardiovasculares aparecen con una mayor incidencia en la población diabética (Beckman y col., 2002), situando la vasculopatía diabética como la principal causa de morbilidad entre los pacientes diabéticos (Stamler y col., 1993; Stratton y col., 2000). Estas enfermedades poseen como característica común ser consecuencia de un estado avanzado de aterosclerosis. La disfunción endotelial, que precede a la aparición de lesiones ateroscleróticas en pacientes diabéticos, incluye una menor vasorelajación, la desaparición acelerada del endotelio capilar, la síntesis alterada de proteínas y una mayor adhesión de monocitos sanguíneos al endotelio vascular; ello conduce a la trans migración de estos monocitos a la capa sub íntima y su posterior retención y diferenciación hacia células espumosas, lo que promueve la iniciación de lesiones ateroscleróticas (Lorenzi, 1992).

Este proceso de reclutamiento de leucocitos desde el torrente sanguíneo hasta el espacio subendotelial es un proceso que, en condiciones fisiológicas, es necesario para que las células del sistema inmune actúen adecuadamente ante una agresión externa. Se trata de un proceso altamente específico y multifactorial, cuya coordinación garantiza el éxito de una respuesta inmune adecuada. En 1991, Butcher y col. describieron los diferentes pasos implicados en este proceso, siendo el primero de ellos un primer contacto, débil, que genera el rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio vascular, seguido de una activación y adhesión más firme de los mismos a la pared del vaso, lo que conduce a su migración transendotelial. Todos estos pasos requieren la expresión de una serie de moléculas de adhesión, tales como ICAM-1 y VCAM-1, en la superficie de las células endoteliales (Rao y col., 2007), que no sólo participan en las interacciones entre células endoteliales vasculares y células sanguíneas (leucocitos y plaquetas) sino que también



interactúan con proteínas de la matriz extracelular desempeñando un papel esencial en la integridad de la pared vascular (Kriegelstein y Granger, 2001). Se ha descrito un aumento de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en las células endoteliales que recubren las lesiones ateroscleróticas, especialmente en la zona denominada como “hombro” de la placa aterosclerótica, tanto en modelos animales de aterosclerosis (Cybulsky y Gimbrone, 1991) como en arterias humanas (Poston y col., 1992; van der Wal y col., 1992).

La hiperglucemia característica de los pacientes diabéticos es considerada desde hace tiempo como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de las complicaciones vasculares asociadas a la diabetes (Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT, 2003). Tanto la hiperglucemia basal como postprandial son capaces de promover un estado oxidativo e inflamatorio en el sistema vascular, y han sido propuestas como factores de riesgo directos para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Esposito y col., 2002; Ceriello, 2005). El suero extraído de pacientes diabéticos es capaz de inducir *in vitro* la expresión de moléculas de adhesión y la adhesión de monocitos humanos en células endoteliales humanas (Morigi y col., 1998; Rasmussen y col., 2002). Sin embargo, no está claro si la concentración elevada de D-glucosa por sí misma es capaz o no de estimular estos mecanismos inflamatorios vasculares. En este contexto, Morigi y col. (1998) observaron un aumento de la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 y un mayor número de interacciones adhesivas entre leucocitos y cultivos de células endoteliales incubadas durante 24 h con 30 mM de D-glucosa. Otros autores también han descrito un aumento de las moléculas de adhesión en células endoteliales humanas incubadas con altas concentraciones de D-glucosa durante un periodo de tiempo entre 24 h y 14 días (Kado y col., 2001; Srinivasan y col., 2003; Piconi y col., 2004; Verrier, 2004; Altannavach y col., 2004; Quagliaro y col., 2005; Takami, 1998). El efecto de la alta concentración de D-glucosa, en ciertos casos, ha sido atribuido a la

hiperosmolaridad alcanzada en el medio de cultivo (Kado y col., 2001).

En contraposición, Kim y col. (1994) no han observado la inducción de ICAM-1 ni de VCAM-1, ni tampoco un aumento de la adhesión de células HL-60, al incubar células endoteliales humanas, durante un periodo de tiempo entre 7 y 10 días, con una elevada concentración de D-glucosa en el medio (25 mM), aunque sí han observado una mayor adhesión de monocitos. De igual manera, Rasmussen y col. (2002) tampoco han detectado ningún aumento en la expresión de VCAM-1 ni de E-selectina en células endoteliales humanas incubadas con 13,5 mM de D-glucosa durante 6 h, lo que sugiere que la expresión incrementada de las moléculas de adhesión en células endoteliales humanas incubadas con suero de pacientes diabéticos puede no ser debido únicamente a la elevada concentración de D-glucosa, sino, tal vez, a la presencia de citoquinas inflamatorias séricas, tal y como proponen estos (Rasmussen y col., 2002). Recientemente, tanto Cacicedo y col., (2004) como Wada y col. (2005) han demostrado que la mera elevación de D-glucosa en el medio tampoco es capaz de inducir la transcripción de los genes que codifican para VCAM-1 o ICAM-1 en células endoteliales humanas.

De acuerdo con estos últimos datos, los resultados *in vitro* obtenidos en el presente trabajo demostraron que la elevación extracelular de D-glucosa desde 5,5 mM hasta 22 mM, es decir, el doble de la concentración plasmática indicativa de diabetes (11,1 mM) tras el test de tolerancia de glucosa oral (The DECODE study group. European Diabetes Epidemiology Group, 1999), no fue capaz de incrementar la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en células HUVEC en cultivo, ni promovió la adhesión de los leucocitos HL-60 a la monocapa de HUVEC en condiciones de flujo, indicando que la simple elevación de la D-glucosa en el medio no es capaz de promover interacciones proinflamatorias entre leucocitos y endotelio.

Las citoquinas pro-inflamatorias, tales como la IL-1 $\beta$ , la IL-6 o el TNF- $\alpha$ , son moléculas clave en el proceso de adhesión leucocitaria y su subsiguiente trans migración a través de la capa endotelial del vaso (Rao y col., 2007). Tanto la IL-1 $\beta$  como el TNF- $\alpha$  son capaces de inducir la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales (Wertheimer y col., 1992) y en células de músculo liso vascular (Chen y col., 2001). Se ha descrito que los niveles circulantes de citoquinas pro-inflamatorias, incluida la IL-1 $\beta$ , se encuentran elevados tanto en modelos animales de diabetes (El-Seweidy y col., 2002) como en pacientes diabéticos (Pickup y col., 2000; Erbagci y col., 2001; Moriwaki y col., 2003; Arnalich y col., 2000). Es interesante resaltar que un incremento agudo en la liberación de citoquinas proinflamatorias durante la hiperglucemia postprandial ha sido descrita en pacientes diabéticos (Esposito y col., 2002; Nappo, 2002), lo que se relaciona con un mayor riesgo cardiovascular (Esposito y col., 2002; Ceriello y col., 2005). Aunque las fuentes de dichas citoquinas circulantes en la diabetes son múltiples (Alexandraki y col., 2006), el tejido adiposo es uno de los principales orígenes, tanto por los adipocitos como por los macrófagos infiltrados, por lo que juega un papel relevante en la diabetes tipo 2 asociada con resistencia a insulina, obesidad y síndrome metabólico (Alexandraki y col., 2006; Arner, 2003; Wellen y Hotamisligil, 2005). En este ambiente crónico de inflamación propio de la diabetes mellitus, se ha descrito un aumento de los niveles circulantes de las formas solubles de ICAM-1 y VCAM-1, y un aumento de su expresión en la membrana celular, tanto en modelos animales de diabetes (Tschope y col., 2005; Gao y col., 2006) como en pacientes diabéticos (Cipollone y col., 2005; Cominacini y col., 1995).

En el presente modelo celular de HUVEC, la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  incrementó los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 expresados en la membrana celular, dando lugar a una mayor adhesión de las células HL-60 al endotelio. A pesar de que, como se ha mencionado, la incubación en presencia de 22 mM de D-glucosa no indujo *per se* la

expresión de las moléculas de adhesión, sí que potenció significativamente la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducida por el tratamiento de las HUVEC con IL-1 $\beta$ , uno de los más potentes inductores de las propiedades adhesivas del endotelio (Rao y col., 2007). De manera análoga, la adhesión inducida por IL-1 $\beta$  de los leucocitos HL-60 a la monocapa de HUVEC bajo condiciones de flujo *in vitro* se vio claramente aumentada en presencia de 22 mM de D-glucosa, aunque esta concentración de D-glucosa por sí misma no indujo la adhesión de leucocitos. Como primera conclusión, estos resultados indican que aunque el aumento en la concentración de D-glucosa en el medio *per se* no es capaz de inducir la expresión de moléculas de adhesión endoteliales ni promover la adhesión de leucocitos a las células endoteliales humanas, parece desempeñar un papel modulador en tales eventos incrementando un estímulo inflamatorio previo.

La falta directa de propiedades inflamatorias de la D-glucosa observada en este trabajo no se limita a las células endoteliales, sino que también se ha observado en otros tipos de células vasculares. Así, se ha descrito recientemente que la elevación de la concentración extracelular de D-glucosa hasta 22 mM no es capaz de inducir respuestas inflamatorias en músculo liso vascular humano, pero sí puede potenciar los mecanismos previamente activados por un estímulo inflamatorio como la IL-1 $\beta$  (Lafuente y col., 2008).

Como continuación de los estudios *in vitro* ya descritos, se diseñó un nuevo abordaje en un modelo *in vivo* más complejo. Así, se analizó el efecto proinflamatorio de la elevación local de la D-glucosa sobre el tráfico leucocitario en la microcirculación mesentérica de la rata, utilizando para ello la técnica de microscopía intravital (Sanz y col., 1999).

Mediante esta técnica, Booth y col. (2001) investigaron en la microvasculatura mesentérica de rata no diabética los efectos de la elevación local de la glucosa sobre las interacciones leucocitos-endotelio, provocando un aumento de la glucosa en el peritoneo

mediante la administración de un bolo único de D-glucosa. Con dicho abordaje, estos autores observaron un aumento del rodamiento de los leucocitos, así como de su adhesividad, 12 h después de la administración intraperitoneal de una dosis moderada (20-25 mg/kg) y otra alta (40-45 mg/kg) de D-glucosa, mientras que no se observó ningún efecto con la dosis más baja (8-10 mg/kg) (Booth y col., 2001).

Por otra parte, Panés y col. (1996) habían observado previamente, con esta misma técnica, en ratas diabéticas un mayor número de leucocitos en fase de rodamiento y una menor velocidad de los mismos en comparación con animales no diabéticos tras la inducción de un evento de isquemia-reperusión. Mediante dos aproximaciones experimentales que simulaban dos modelos de hiperglucemia, analizaron el papel de la glucosa sobre el tráfico leucocitario. Así, el primer modelo, que simulaba una hiperglucemia postprandial, consistía en la administración en ratas controles de un bolo de 480 mg/dl de glucosa en el mesenterio. El segundo modelo remedaba una hiperglucemia sistémica, en la que se incrementaron los niveles plasmáticos de glucosa hasta niveles correspondientes a un estado diabético mediante la infusión continua de glucosa por vía intravenosa durante 30 y 80 minutos. En ambos modelos estudiados, la hiperglucemia inducida no fue capaz por sí misma de aumentar el tráfico leucocitario observado previamente en ratas diabéticas, sugiriendo que la inflamación vascular observada en la diabetes no se debe exclusivamente a la hiperglucemia sino que es necesaria la presencia de otros factores para el establecimiento de un evento inflamatorio (Panés y col., 1996).

Con estos antecedentes, se estableció un protocolo experimental análogo al descrito por Booth y col. (2001), induciendo una elevación local aguda de glucosa, análoga a lo que ocurre en la hiperglucemia postprandial que ha sido directamente relacionada en pacientes diabéticos con un aumento de citoquinas inflamatorias circulantes asociadas a un aumento del riesgo cardiovascular (Esposito y col., 2002; Ceriello y col., 2005). Así, se

administraron 40 mg/kg de D-glucosa por vía intraperitoneal y 18 h después se analizó la adhesión de leucocitos al endotelio, el flujo leucocitario, la migración transendotelial y la velocidad de rodamiento en vénulas postcapilares mesentéricas. Asimismo, se valoró el número de leucocitos adheridos a la pared vascular en las arteriolas mesentéricas. Ninguno de estos parámetros se vió modificado en animales que habían recibido el bolo de glucosa. Sin embargo, 18 h tras la administración de IL-1 $\beta$  (200 ng/kg), se observó un aumento significativo del número de leucocitos en fase de rodamiento, así como una disminución de la velocidad de rodamiento de los mismos. También se incrementó la adhesión en vénulas y arteriolas, así como la migración leucocitaria en vénulas postcapilares. En definitiva, se observaron todas las características de una clara respuesta inflamatoria a la IL-1 $\beta$ . Por otra parte, cuando se administraron conjuntamente la IL-1 $\beta$  (200 ng/kg) y la de D-glucosa (40 mg/kg), todos los parámetros inflamatorios inducidos por la IL-1 $\beta$  se incrementaron, exacerbando el reclutamiento, la adhesión y la transmigración leucocitaria. Por otra parte, los estudios inmunohistoquímicos e histológicos realizados sobre el tejido mesentérico de estos animales tratados con IL-1 $\beta$  revelaron un aumento de la expresión titular de ICAM-1 y VCAM-1, así como una mayor presencia leucocitaria. Estos fenómenos proinflamatorios se vieron potenciados cuando los animales recibieron conjuntamente IL-1 $\beta$  y D-glucosa.

En resumen, estos resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* sugieren que la hiperglucemia *per se* no es suficiente para causar una inflamación en el endotelio, sino que es necesario un preconditionante inflamatorio para que la elevación de la glucosa sea perjudicial en el sistema vascular. Así, las concentraciones de glucosa postprandial anormalmente incrementadas solamente podrían estar exacerbando los efectos de una respuesta inflamatoria previa. Cabe destacar que en pacientes diabéticos, se ha descrito una mayor liberación a la circulación de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-18, durante el

periodo posprandial que en sujetos no diabéticos (Esposito y col., 2002). En este sentido, los resultados sugieren que la hiperglucemia postprandial estaría promoviendo el desarrollo de la vasculopatía diabética al potenciar una reacción inflamatoria (Pradhan, 2001; Hotamisligil, 1995). Asimismo, el efecto sinérgico observado en este trabajo entre las altas concentraciones de glucosa y la inflamación podría también explicar por qué la expresión de las moléculas de adhesión y otras moléculas relacionadas con procesos inflamatorios en respuesta a una infección es mayor en modelos experimentales de diabetes (Lu y col., 2004).

Estas observaciones destacan la relevancia de la inflamación en el desarrollo de la diabetes mellitus y sus complicaciones vasculares. Así, la inflamación, potenciada a su vez por la hiperglucemia, estaría en la base del desarrollo acelerado de lesiones ateroscleróticas conducentes a enfermedad macrovascular. Por otra parte, se ha observado que el tratamiento a largo plazo con IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  es capaz de inducir resistencia a insulina en adipocitos de ratón y humanos (Houstis y col., 2006), apoyando un papel crucial del componente inflamatorio en la fisiopatología de la diabetes mellitus.

Desde un punto de vista terapéutico, además de disminuir los niveles de glucosa circulantes, la reducción de la inflamación crónica se presenta como una diana terapéutica de gran relevancia a la hora de tratar la diabetes mellitus y prevenir sus complicaciones (Dilley y Little, 2008). En este contexto, aquellas aproximaciones dirigidas a reducir la inflamación sistémica, mediante fármacos, ejercicio físico o dieta (Kasapis y Thompson, 2005), pueden proporcionar un beneficio incrementado para prevenir los eventos cardiovasculares asociados tanto al síndrome metabólico como a la diabetes tipo 2.

***Activación de señalizadores de inflamación en células endoteliales humanas por IL-1 $\beta$  y su modulación por D-glucosa***

Algunos autores han descrito que el aumento de la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, inducida por citoquinas proinflamatorias, implica directamente la activación de NF- $\kappa$ B, siendo este factor de transcripción un elemento crucial para la respuesta inflamatoria (Collins y col., 1995; Chen y Manning, 1995).

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es bien conocido como un elemento clave implicado en la transcripción de múltiples genes relacionados con la inflamación (Lenardo y Baltimore, 1989; Baeuerle, 1991, Collins, 1993) y se estimula por agentes inflamatorios como la IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$  y el LPS (Read y col., 1994; Barnes y Karin, 1997). Se ha descrito una mayor actividad de NF- $\kappa$ B tanto en aorta de modelos experimentales de diabetes (Nishigaky y col., 1999) como en células mononucleares de pacientes diabéticos (Bierhaus y col., 2001), confirmando la presencia de un estado inflamatorio crónico en la diabetes (Pickup y col., 2000; Erbagci y col., 2001).

La cascada de señalización por la cual la IL-1 $\beta$  activa NF- $\kappa$ B ha sido bien definida (Ninomiya-Tsuji y col., 1999). Aunque existen dos tipos de receptores para IL-1 (tipo I y tipo II) (Martin y Falk, 1997) sólo el receptor tipo I (IL-1R1) es capaz de activar, tras la unión de IL-1 $\beta$ , la ruta de transducción de señales que implica la activación consecutiva del factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6) - quinasa inductora de NF- $\kappa$ B (NIK) - quinasas de I $\kappa$ B, IKK ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) - I $\kappa$ B ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) - NF- $\kappa$ B (Ninomiya-Tsuji, 1999). Sin embargo, el papel que juega la hiperglucemia en el establecimiento de un ambiente inflamatorio, y en concreto, en la activación de NF- $\kappa$ B, sigue siendo controvertido. Algunos autores afirman que la elevación extracelular de D-glucosa es capaz de inducir directamente la activación de NF- $\kappa$ B, tanto en células endoteliales (Morigi y col., 1998) como en células de músculo liso vascular (Yerneni y col., 1998). En dichos trabajos las



concentraciones de D-glucosa empleadas, 25 y 30 mM (correspondientes a una glucemia de 450 y 520 mg/dl respectivamente), no descartaban el potencial efecto de la hiperosmolaridad, efecto que debe tenerse en cuenta ya que a través de la inducción de estrés celular inducido por un choque osmótico, se pueden activar diferentes proteínas señalizadoras como las MAPKs (Raingeaud y col., 1995), o el NF- $\kappa$ B (Németh y col., 2002).

En el presente trabajo, la elevación de D-glucosa (22 mM) en el medio de cultivo de las HUVEC no fue estímulo suficiente, a ninguno de los tiempos estudiados (desde 1 hasta 18 h), para provocar la activación y traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo. De forma análoga, Cacicedo y col. (2004) y Busik y col. (2008), utilizando cultivos de HUVEC, no observaron un aumento en la actividad de NF- $\kappa$ B al elevar los niveles de glucosa presente en el medio de cultivo hasta 25 mM durante 24 h o cuatro semanas, respectivamente. Lafuente y col. (2008) tampoco observaron una mayor actividad de NF- $\kappa$ B en cultivos de células de músculo liso de aorta humana tras 18 h de incubación en un medio con 22 mM de D-glucosa.

Como se ha mencionado anteriormente, entre los diferentes estímulos capaces de provocar la activación de NF- $\kappa$ B, e inducir la transcripción de genes regulados por este factor de transcripción, se encuentran diferentes citoquinas proinflamatorias (Chen y col., 2000; Zhou y col., 2007). De acuerdo con esto, en nuestro modelo celular la IL-1 $\beta$  fue capaz de inducir la activación de NF- $\kappa$ B siguiendo un modelo bifásico. A pesar de que la elevación de la concentración de D-glucosa en el medio de cultivo no fue capaz de inducir la activación de NF- $\kappa$ B por sí sola, sí que provocó un aumento de la activación de NF- $\kappa$ B mayor que la inducida por la IL-1 $\beta$  en 5,5 mM de D-glucosa, lo que se corresponde con el efecto sinérgico observado anteriormente en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 así como

en la adhesión leucocitaria.

Para establecer si la activación de NF- $\kappa$ B estaba mediando la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducida por IL-1 $\beta$  en las HUVEC, se empleó PDTC como inhibidor de NF- $\kappa$ B. El PDTC inhibió marcadamente la activación de NF- $\kappa$ B estudiada mediante EMSA, lo que validaba este compuesto como inhibidor de NF- $\kappa$ B en nuestro modelo celular. Durante muchos años, los mecanismos de regulación de ICAM-1 y VCAM-1 descritos hasta el momento apuntaban hacia una estrecha similitud, siendo NF- $\kappa$ B el factor que ejercía un papel predominante en la regulación de su expresión (Collins y col., 1995; Chen y Manning, 1995; Mackenzie y col., 2007). Por ello, en el presente trabajo se esperaba una disminución de ambas moléculas de adhesión en las HUVEC incubadas con PDTC. Sin embargo, ya que sólo se pudo observar la abolición de la expresión de VCAM-1, mientras que ICAM-1 permaneció invariable, nuestros resultados apuntan a que la regulación de ambas moléculas de adhesión no ocurre de la misma manera. Un efecto similar ha sido observado por Zerfaoui y col. (2008), lo que sugiere que la expresión de ICAM-1 inducida por IL-1 $\beta$  implica la actuación de otro u otros factores de transcripción diferentes de NF- $\kappa$ B.

Existen otros factores de transcripción, distintos de NF- $\kappa$ B, que pueden estar mediando la expresión de ICAM-1. Así, se ha propuesto que el factor AP-1 puede unirse al promotor de ICAM-1 mediante secuencias específicas (Voraberger y col., 1991; Degitz y col., 1991). AP-1 es un factor de transcripción formado por dímeros de las familias Fos (c-fos, FosB y Fra-1) y Jun (c-jun, JunD y JunB) (Angel y Karin, 1991). Únicamente los homodímeros de la familia Jun o los heterodímeros entre los miembros de las familias Jun y Fos son capaces de inducir la transcripción génica, mientras que los homodímeros formados por miembros de la familia Fos no son estables y no poseen capacidad

transcripcional por sí mismos (Angel y Karin, 1991). Puesto que la proteína AP-1 puede ser activada por agentes inflamatorios presentes en lesiones ateroscleróticas (Barath y col., 1990; Moyer y col., 1991), AP-1 es otro factor de transcripción que desempeña un papel importante en la regulación de enfermedades inflamatorias de la pared vascular (Ahmad y col., 1998).

Se ha propuesto que PDTC es capaz de inducir en HUVEC la expresión de ICAM-1, pero no de VCAM-1, a través de la activación de AP-1 (Muñoz y col., 1996; Liao y col., 2000). Estos y otros autores han descrito que AP-1 es un factor de transcripción capaz de responder no sólo ante estímulos de estrés oxidativo, sino ante agentes antioxidantes como el propio PDTC o las tioredoxinas (Meyer y col., 1993; Schenk y col., 1994). Este efecto podría ser una posible explicación para la falta de inhibición de la expresión de ICAM-1 por parte de PDTC.

Además de NF- $\kappa$ B, la familia de las MAPK desempeña un papel muy importante en la señalización celular. Las MAPKs son un grupo de proteínas quinasas que, mediante la activación consecutiva de los diferentes miembros que forman esta gran familia, dan lugar a la regulación de múltiples procesos, desde el crecimiento y diferenciación celular hasta la regulación de procesos inflamatorios, en función de los estímulos extracelulares que las activan (Kyriakis y Avruch, 2001). El efecto que pueda ejercer la hiperglucemia sobre la activación de las MAPKs no ha sido estudiado en profundidad. En modelos experimentales de diabetes se ha descrito un aumento de la activación de ERK 1/2, tanto en células glomerulares (Awazu y col., 1999) como en células vasculares (Igarashi y col., 2007). También en pacientes diabéticos se ha observado un incremento de la actividad de ERK 1/2 en células renales. Sin embargo, si la elevación de la glucosa extracelular por sí misma es capaz de inducir la fosforilación de ERK 1/2 es un tema aún controvertido. Xin y col. (2004) han descrito la activación de ERK 1/2 en células endoteliales humanas

incubadas en un medio con 25 mM de D-glucosa durante 24 h. Sin embargo, ni Liu y col. (2000) ni Busik y col. (2008) han observado la activación de ERK 1/2 tras la incubación de células endoteliales bovinas y humanas, respectivamente, con 25 mM de D-glucosa durante un periodo de tiempo entre 24 y 96 h. A su vez, Purves y col. (2001), en un modelo experimental de neuropatía diabética, han observado en neuronas de animales diabéticos una mayor activación de ERK 1/2. Sin embargo, los cultivos de neuronas de animales no diabéticos, sometidos a concentraciones crecientes de D-glucosa (10 – 50 mM) no presentaron una mayor activación de ERK 1/2, lo que sugiere que la activación de ERK 1/2 en animales diabéticos no se debe exclusivamente a la hiperglucemia (Purves y col., 2001). Tampoco Lafuente y col., (2008) observaron una mayor actividad de ERK 1/2 en células de músculo liso vascular humano cultivadas en presencia de 22 mM de D-glucosa. En nuestro trabajo, el aumento de la concentración de D-glucosa en el medio de cultivo no provocó un aumento significativo de la activación de ERK 1/2 en HUVEC en los diferentes tiempos estudiados (5 min - 60 min).

Aunque, en un principio, la familia de ERK 1/2 se relacionó con procesos implicados en el ciclo celular, cuya activación era mediada por factores de crecimiento a través de la unión a sus receptores y la activación de la vía Ras - Raf - MEK 1/2 - ERK 1/2 (Robbins y col., 1992), también ERK 1/2 puede ser activada por estímulos inflamatorios como la IL-1 $\beta$ , tal y como se ha descrito en células de músculo liso vascular de rata (Jiang y col., 2000) y en cultivos de músculo liso de aorta humana (Lafuente y col., 2008). De acuerdo con estos trabajos, en este modelo celular de HUVEC se observó que la IL-1 $\beta$  era capaz de activar ERK 1/2, y que esta activación fue significativamente potenciada en presencia de elevadas concentraciones de D-glucosa.

El papel que juega ERK 1/2 u otros miembros de la familia MAPKs en la regulación de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales en estados de

inflamación es un tema que genera cierta controversia. Mientras que Chen y col. (2000) y Zhou y col. (2007) han descrito que la inducción de ICAM-1 y VCAM-1 por IL-1 $\beta$  en células epiteliales o por TNF- $\alpha$  en HUVEC, respectivamente, es independiente de la activación de ERK 1/2, Lin y col. (2005) afirman que ERK 1/2 está implicada en la expresión de ICAM-1 inducida por IL-1 $\beta$  en células epiteliales humanas. En nuestro trabajo se observó que la expresión de VCAM-1, pero no de ICAM-1, inducida por IL-1 $\beta$  en HUVEC depende de ERK 1/2. Así, en presencia del inhibidor de PD 98059, que evita la fosforilación y activación de ERK 1/2, la expresión de VCAM-1 inducida por IL-1 $\beta$  se abolió por completo, mientras que la de ICAM-1, no sólo no se redujo sino que aumentó significativamente.

Por tanto, estos resultados sugieren la existencia de un eje inflamatorio ERK 1/2 - NF- $\kappa$ B - VCAM-1, estimulado por IL-1 $\beta$  y potenciado por la elevación extracelular de la D-glucosa, análogo al previamente demostrado en células musculares lisas humanas para ERK 1/2 - NF- $\kappa$ B - iNOS (Lafuente y col., 2008). Sin embargo, los mecanismos de señalización de ICAM-1 parecen ser independientes de este eje. Aunque en el presente trabajo no se haya identificado la ruta de señalización de ICAM-1 inducida por IL-1 $\beta$ , si se ha observado que también es potenciada por altas concentraciones de D-glucosa, indicando que el eje ERK 1/2 - NF- $\kappa$ B - VCAM-1 no es la única ruta inflamatoria potenciada por un aumento extracelular de glucosa.

### ***Modulación de la expresión de GLUT-1 y de la entrada de glucosa por IL-1 $\beta$***

Finalmente, en el presente trabajo se exploró algún posible mecanismo que pudiera justificar el hecho de que la elevación de la D-glucosa, aunque carezca de efecto

inflamatorio propio, sea capaz de potenciar las respuestas inducidas por citoquinas proinflamatorias.

La mayoría de las células son capaces de regular la entrada de D-glucosa en un ambiente hiperglucémico manteniendo las concentraciones intracelulares constantes. Sin embargo, algunos autores apuntan a que las células vasculares, y en particular las células endoteliales, no son capaces de modular la entrada de D-glucosa cuando se encuentran en un ambiente hiperglucémico, siendo más vulnerables al daño celular provocado por un aumento de glucosa intracelular (Brownlee, 2001). Se ha propuesto que en este tipo de células, la glucosa extracelular puede entrar libremente al interior de las células endoteliales a través del transportador de glucosa independiente de insulina GLUT-1 (Ceriello, 2003).

Sobre esta base se apoya la teoría integradora, propuesta para explicar el daño endotelial inducido por la elevación de D-glucosa extracelular (Brownlee, 2001), que propone que la elevación de glucosa intracelular da lugar a la superproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), especialmente de aniones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), a nivel de la mitocondria. Se han postulado cuatro mecanismos por los cuales dicha generación de  $O_2^{\cdot-}$  mitocondrial produciría daño celular y en último termino disfunción endotelial: (1) una activación excesiva de la vía de los polioles, que conllevaría un agotamiento de dinucleótidos de nicotiamida-adenina fosfato (NADPH), esenciales para regenerar antioxidantes celulares como el glutatión; (2) un aumento de la formación, mediante reacciones de glicosilación no enzimática, de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs), capaces de dañar macromoléculas celulares; (3) una excesiva formación de diacilglicerol (DAG) y la subsiguiente activación de la proteína quinasa C (PKC), capaz a su vez de activar enzimas generadoras de ROS, como la NADPH oxidasa y (4) una excesiva actividad de ruta de las hexosaminas, capaz de transformar fructosa 6-fosfato en uridina

difosfato-N-acetil glucosamina, compuesto capaz de modular la expresión génica de la célula induciendo la transcripción de genes relacionados con la inflamación.

La idea de que glucosa puede entrar libremente en las células vasculares no es compartida por todos los autores; en este sentido, se ha descrito que tanto las células endoteliales como las células de músculo liso vascular son capaces de regular la entrada de glucosa (Kaiser y col., 1993; Alpert y col., 2005). Así, la incubación en un medio con 23 mM de D-glucosa de células de músculo liso y endoteliales de aorta bovina durante 24 y 48 h respectivamente, produjo una disminución de los transportadores GLUT-1 a nivel de ARNm, proteína total y localización en la membrana plasmática (Kaiser y col, 1993; Alpert y col, 2002). Esta disminución de los transportadores de glucosa se tradujo, en ambos casos, en una menor entrada de glucosa, sugiriendo que las células vasculares sí son capaces de modular la entrada de glucosa en un ambiente hiperglucémico (Kaiser y col, 1993; Alpert y col, 2005).

Esta regulación de la entrada de glucosa no se limita únicamente a las células vasculares, sino que en células gliales (Walter y col., 1988), en adipocitos 3T3L1 (Tordjman y col., 1990) y en fibroblastos (Wertheimer y col., 1991) se ha observado que el aumento extracelular de D-glucosa provoca una menor expresión de los transportadores GLUT-1 y una menor captación de glucosa tritiada.

En nuestro trabajo, en consonancia con estos estudios previos, la elevación extracelular de los niveles de D-glucosa tampoco se tradujo en un aumento de captación de glucosa radiactiva por las HUVEC ni en un aumento de los niveles totales de GLUT-1; sí se observó, sin embargo, una tendencia a disminuir el número de transportadores GLUT-1 localizados en la membrana plasmática. Por el contrario, el tratamiento de las HUVEC con IL-1 $\beta$  provocó un aumento de los niveles totales de GLUT-1 así como del número de transportadores localizados en la membrana plasmática, lo que se tradujo en una mayor

captación de  $[H^3]$ -2-DOG. Aunque la mera elevación extracelular de D-glucosa no modificó los niveles de GLUT-1, sí potenció significativamente el número de transportadores inducidos por IL-1 $\beta$ .

Estos resultados concuerdan con la capacidad de algunos factores de crecimiento y citoquinas proinflamatorias para modular los niveles de los transportadores GLUT-1. En células endoteliales bovinas, el tratamiento con TNF- $\alpha$  o con VEGF durante 17 h produjo un aumento de ARNm de GLUT-1, así como una mayor incorporación de glucosa (Pekala y col., 1990). También en otros tipos celulares como condrocitos (Shikhman y col., 2001) y adipocitos 3T3L1 (Stephens y col., 1992), el TNF- $\alpha$  es capaz de aumentar el número de transportadores GLUT-1. De manera análoga, la citoquina IL-1 $\beta$  da lugar a un aumento de GLUT-1 y a una mayor captación de glucosa en fibroblastos (Bird y col., 1990) y en condrocitos (Shikhman y col., 2001).

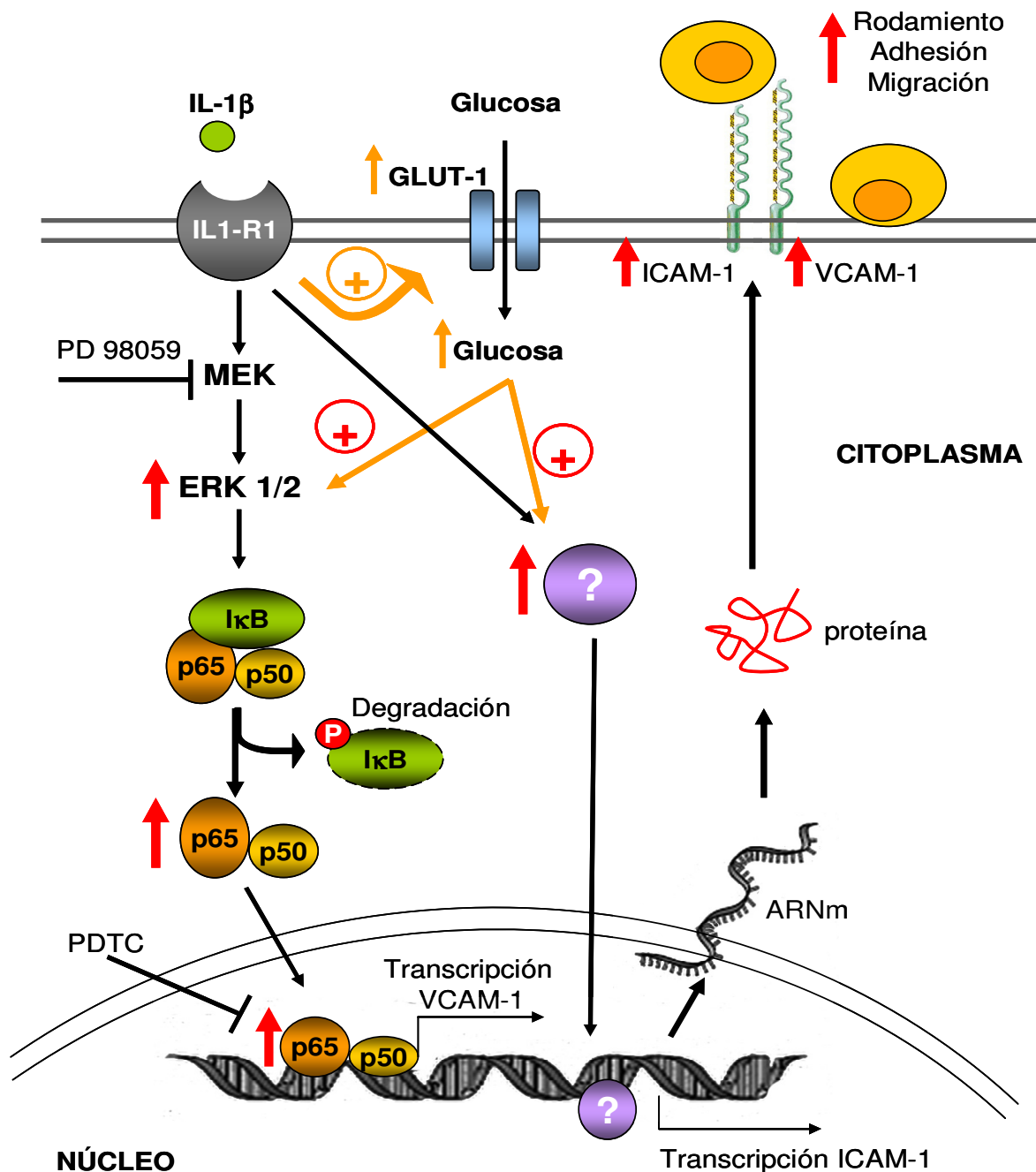
Por lo tanto, aunque se haya propuesto que la hiperglucemia por sí misma es capaz de inducir una respuesta inflamatoria en las células vasculares debido a una entrada indiscriminada de glucosa en el endotelio (Brownlee, 2001), nuestros datos discrepan claramente de esta hipótesis, ya que en las HUVEC la mera elevación de D-glucosa extracelular no conlleva un aumento de la concentración intracelular de la misma. De hecho, esto se explica porque los transportadores GLUT-1 presentan una alta afinidad ( $K_m$ : 0,5 - 3,7 mM) y baja capacidad para la D-glucosa, de tal manera que a concentraciones fisiológicas de D-glucosa, estos transportadores trabajan ya cerca de su velocidad máxima de transporte (Mueckler, 1994; Mann y col., 2003). Por tanto, una mayor entrada de glucosa en este tipo celular requiere un aumento del número de transportadores GLUT-1 en la membrana plasmática, tal y como ocurre en presencia de IL-1 $\beta$ .

Nuestros resultados sugieren también que el aumento de los transportadores de



glucosa GLUT-1 mediada por la IL-1 $\beta$  podría ser la vía de entrada de glucosa al interior de la célula y el enlace por el cual el aumento de la concentración extracelular de D-glucosa, en presencia de un estímulo inflamatorio, da lugar a un aumento de la concentración intracelular de D-glucosa, exacerbando el estado inflamatorio previo presente en la célula endotelial, mediante mecanismos todavía por esclarecer (Figura 40).

En conclusión, este trabajo pretende dilucidar cómo el aumento de la D-glucosa extracelular puede provocar un daño en las células endoteliales, favoreciendo la aparición de eventos tempranos en el proceso aterosclerótico. Hemos comprobado que por sí sola la D-glucosa no provoca la activación de diferentes marcadores inflamatorios, pero, sin embargo, es capaz de potenciar el efecto inflamatorio inducido por una citoquina como es la IL-1 $\beta$ . Aunque es necesario profundizar en los mecanismos estudiados y diseñar nuevos abordajes experimentales utilizando modelos *in vivo*, destacamos la necesidad de que una aproximación terapéutica para el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones vasculares actúe no sólo sobre la hiperglucemia, sino también sobre la inflamación crónica a nivel sistémico



**Figura 40:** La IL-1β aumenta la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 en las HUVEC, mediante la activación del eje inflamatorio ERK 1/2 - NF-κB. Asimismo, la IL-1β activa la expresión de ICAM-1, mediante un mecanismo independiente de dicho eje. Esto se traduce en un mayor reclutamiento de leucocitos por parte de las células endoteliales. La elevación extracelular de D-glucosa no provoca por sí misma la activación de estas rutas, pero sí potencia el efecto inducido por la IL-1β (flechas en rojo). La falta de efecto de la D-glucosa sola puede explicarse porque no hay una mayor entrada de D-glucosa al interior celular. Sin embargo, en presencia de IL-1β, aumenta el número de transportadores GLUT-1 en la membrana plasmática, facilitando la entrada de D-glucosa al interior celular (flechas en naranja). Dentro de la célula endotelial, el incremento de D-glucosa exacerba, mediante mecanismos todavía por esclarecer, las vías de señalización y el reclutamiento leucocitario activados por la IL-1β.

## ***Conclusiones***

El objetivo global de este trabajo ha sido analizar, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, si la elevación extracelular de D-glucosa es capaz de promover un evento inflamatorio en células endoteliales.

Las principales conclusiones obtenidas en este trabajo han sido:

1. La elevación de la concentración de D-glucosa no indujo la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 ni VCAM-1 por sí sola en HUVEC. La IL-1 $\beta$  aumentó la expresión tanto de ICAM-1 y VCAM-1. Este efecto fue exacerbado en presencia elevadas concentraciones de D-glucosa, independientemente de los efectos de la hiperosmolaridad.
2. La elevación de D-glucosa *per se* no promovió la adhesión de leucocitos HL-60 a las HUVEC, pero incrementó la adhesión de los leucocitos HL-60 inducida por IL-1 $\beta$ .
3. Las altas concentraciones de D-glucosa no activó las moléculas de señalización celular ERK 1/2 ni NF- $\kappa$ B en HUVEC, pero potenció la activación inducida por IL-1 $\beta$ . La activación de ERK 1/2 y NF- $\kappa$ B median la expresión de VCAM-1 pero no de ICAM-1, inducida por IL-1 $\beta$ .
4. La IL-1 $\beta$  incrementa los niveles totales del transportador de glucosa-1 (GLUT-1) y expresados en la membrana celular en HUVEC. La elevación de D-glucosa no modifica los niveles de GLUT-1, pero incrementa los niveles de GLUT-1 inducidos por IL-1 $\beta$ .
5. Los estudios *in vivo* revelaron que la inyección de D-glucosa en ratas Sprague-Dawley no aumentó los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 ni alteró el tráfico leucocitario en

vénulas postcapilares mesentéricas. Sin embargo, la inyección de D-glucosa potenció los cambios del tráfico leucocitario inducidos por la IL-1 $\beta$ , incluyendo un aumento del número de leucocitos en rodamiento, adheridos y migrados al mismo tiempo que disminuyó la velocidad de rodamiento.

Estos resultados indican que aunque la elevación extracelular de D-glucosa *per se* no causa inflamación en células endoteliales, pero sí desempeña un papel modulador en la inflamación vascular intensificando la acción de otros estímulos inflamatorios. Por todo ello, proponemos que la hiperglucemia no es suficiente para causar directamente un efecto inflamatorio, pero puede exagerar los efectos de una respuesta inflamatoria en curso. Este trabajo sugiere que las aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la vasculopatía diabética deberían disminuir no sólo los niveles de glucosa plasmática, sino también reducir el ambiente proinflamatorio vascular presente.

## ***Conclusions***

The main objective of the present work was to analyze, both *in vitro* and *in vivo*, whether the elevation of extracellular D-glucose is able to promote an inflammatory event in endothelial cells.

The main conclusions from the present study are:

1. High D-glucose does not induce adhesion molecules, ICAM-1 or VCAM-1, levels by itself in HUVEC. IL-1 $\beta$  increases ICAM-1 and VCAM-1 expression. This effect is exacerbated in the presence of high extracellular D-glucose, independently of hyperosmolarity.
2. High D-glucose *per se* does not promote HL-60 leukocyte adhesion to HUVEC, but increases leukocyte adhesion induced by IL-1 $\beta$ .
3. High D-glucose alone does not modify the activity of the signalling molecules ERK 1/2 and NF- $\kappa$ B in HUVEC, but it potentiates their activation by IL-1 $\beta$ . ERK 1/2 and NF- $\kappa$ B activation mediate VCAM-1, but not ICAM-1, expression induced by IL-1 $\beta$ .
4. IL-1 $\beta$  increases glucose transporter-1 (GLUT-1) levels in the whole cell and in the cell membrane in HUVEC. High D-glucose does not modify GLUT-1 levels, but it increases GLUT-1 levels induced by IL-1 $\beta$ .
5. *In vivo* studies reveal that D-glucose injection in Sprague-Dawley rats does not increase ICAM-1 or VCAM-1 levels nor alters leukocyte trafficking in mesenteric postcapillary venules. Nevertheless, high D-glucose potentiates trafficking changes induced by IL-1 $\beta$ , including increased venular leukocyte rolling flux, adhesion, and transmigration, and decreased rolling velocity.

These results indicate that although high D-glucose *per se* does not cause inflammation in human and rat vascular endothelial cells, it does play a modulatory role in vascular inflammation by enhancing the effect of other pro-inflammatory factors. Therefore, we propose that diabetic hyperglycemia may not be sufficient to cause vascular inflammation but can exaggerate the effects of an ongoing inflammatory response. We suggest that the therapeutic approaches for diabetic vasculopathy should aim to lower not only the levels of plasmatic glucose but also to reduce the pro-inflammatory vascular environment.



## ***Bibliografia***

- Abadal L.T, Puig T., Balaguer Vintó I. (2000) Incidence, mortality and risk factors for stroke in the Manresa Study: 28 years of follow-up. *Rev Esp Cardiol* **53**:15-20.
- Aggarwal BB, Takada Y, Shishodia S, Gutierrez AM, Oommen OV, Ichikawa H, Baba Y, Kumar A (2004) Nuclear transcription factor NF-kappa B: role in biology and medicine. *Indian J Exp Biol* **42**: 341-353
- Ahmad M, Theofanidis P, Medford RM (1998) Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* **273**: 4616-4621
- Albelda SM (1991) Endothelial and epithelial cell adhesion molecules. *Am J Respir Cell Mol Biol* **4**: 195-203
- Albelda SM and Buck CA (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* **4**: 2868-2880
- Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, Singh J, Alaveras A, Kalofoutis A (2006) Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. *Ann N Y Acad Sci* **1084**: 89-117,
- Alpert E, Gruzman A, Riahi Y, Blejter R, Aharoni P, Weisinger G, Eckel J, Kaiser N, Sasson S (2005) Delayed autoregulation of glucose transport in vascular endothelial cells. *Diabetologia* **48**: 752-755
- Alpert E, Gruzman A, Totary H, Kaiser N, Reich R, Sasson S (2002) A natural protective mechanism against hyperglycaemia in vascular endothelial and smooth-muscle cells: role of glucose and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Biochem J* **362**: 413-422
- Altannavch T.S., Roubalova K., Kucera P., Andel M. (2004) Effect of high glucose concentrations on expression of ELAM-1, VCAM-1 and ICAM-1 in HUVEC with and without cytokine activation. *Physiol Res* **53**: 77-82
- Angel P and Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* **1072**: 129-157
- Aras R., Sowers J.R., Arora R. (2005) The proinflammatory and hypercoagulable state of diabetes mellitus. *Reviews in cardiovascular medicine* **6**: 84-97
- Ardman B, Sikorski MA, Staunton DE (1992) CD43 interferes with T-lymphocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5001-5005
- Arnalich F, Hernanz A, Lopez-Maderuelo D, Pena JM, Camacho J, Madero R, Vazquez JJ, Montiel C (2000) Enhanced acute-phase response and oxidative stress in older adults with type II diabetes. *Horm Metab Res* **32**: 407-412
- Arner P (2003) The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab* **14**: 137-145
- Awazu M, Ishikura K, Hida M, Hoshiya M (1999) Mechanisms of mitogen-activated protein kinase activation in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol* **10**: 738-745
- Baeuerle PA (1991) The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta* **1072**: 63-80
- Baeuerle PA and Baltimore D (1988) I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* **242**: 540-546
- Baeuerle PA and Henkel T (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* **12**: 141-179

- Barath, P., Cao, J., Forrester, J.S. (1990). Low density lipoprotein activates monocytes to express tumor necrosis factor. *FEBS letters*, **277**: 180-184.
- Barnes PJ and Karin M (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* **336**: 1066-1071
- Beckman JA, Creager MA, Libby P (2002) Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* **287**: 2570-2581
- Beinke S and Ley SC (2004) Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* **382**: 393-409
- Berendt AR, McDowall A, Craig AG, Bates PA, Sternberg MJ, Marsh K, Newbold CI, Hogg N (1992) The binding site on ICAM-1 for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site. *Cell* **68**: 71-81
- Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, Weissman IL, Hamann A, Butcher EC (1993) Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* **74**: 185-195
- Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr, Seed B (1989) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* **243**: 1160-1165
- Bevilacqua, M., Butcher, E., Furie, B., Furie, B., Gallatin, M., Gimbrone, M., Harlan, J., Kishimoto, K., Lasky, L., McEver, R. *et al.* (1991) Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell* **67**: 233.
- Bierhaus A, Schiekhofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Kloting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Haring HU, Schleicher E, Nawroth PP (2001) Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* **50**: 2792-2808
- Bird TA, Davies A, Baldwin SA, Saklatvala J (1990) Interleukin 1 stimulates hexose transport in fibroblasts by increasing the expression of glucose transporters. *J Biol Chem* **265**: 13578-13583
- Booth G., Stalker T.J., Lefer A.M., Scalia R. (2001) Elevated ambient glucose induces acute inflammatory events in the microvasculature: effects of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**: E848-E856
- Bosch X, Alfonso F, Bermejo J (2002) Diabetes and cardiovascular disease. A comprehensive insight to the new epidemic of the 21st century. *Rev Esp Cardiol* **55**: 525-527
- Boulares AH, Zoltoski AJ, Sherif ZA, Jolly P, Massaro D, Smulson ME (2003) Gene knockout or pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 prevents lung inflammation in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**: 322-329
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**: 663-675
- Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D (1996) Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* **97**: 1715-1722
- Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**: 813-820

- Brunet A and Pouyssegur J (1997) Mammalian MAP kinase modules: how to transduce specific signals. *Essays Biochem* **32**: 1-16
- Busik JV, Mohr S, Grant MB (2008) Hyperglycemia-induced reactive oxygen species toxicity to endothelial cells is dependent on paracrine mediators. *Diabetes* **57**: 1952-1965
- Butcher E.C. (1991) Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* **67**: 1033-1036
- Buzzard CJ, Pfister SL, Campbell WB (1993) Endothelium-dependent contractions in rabbit pulmonary artery are mediated by thromboxane A<sub>2</sub>. *Circ Res* **72**: 1023-1034
- Cacicedo JM, Yagihashi N, Keaney JF, Jr, Ruderman NB, Ido Y (2004) AMPK inhibits fatty acid-induced increases in NF-kappaB transactivation in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **324**: 1204-1209
- Camerini D, James SP, Stamenkovic I, Seed B (1989) Leu-8/TQ1 is the human equivalent of the Mel-14 lymph node homing receptor. *Nature* **342**: 78-82
- Ceriello A (2003) New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care* **26**: 1589-1596
- Ceriello A (2005) Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes* **54**: 1-7
- Chacon MR, Fernandez-Real JM, Richart C, Megia A, Gomez JM, Miranda M, Caubet E, Pastor R, Masdevall C, Vilarrasa N, Ricard W, Vendrell J (2007) Monocyte chemoattractant protein-1 in obesity and type 2 diabetes. Insulin sensitivity study. *Obesity (Silver Spring)* **15**: 664-672
- Chakraborti S and Chakraborti T (1998) Oxidant-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear transcription factors in the cardiovascular system: a brief overview. *Cell Signal* **10**: 675-683
- Chan BM, Elices MJ, Murphy E, Hemler ME (1992) Adhesion to vascular cell adhesion molecule 1 and fibronectin. Comparison of alpha 4 beta 1 (VLA-4) and alpha 4 beta 7 on the human B cell line JY. *J Biol Chem* **267**: 8366-8370
- Chen CC and Manning AM (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: a dominant role for NF-kappa B. *Agents Actions Suppl* **47**: 135-141
- Chen CC, Chen JJ, Chou CY (2000) Protein kinase calpha but not p44/42 mitogen-activated protein kinase, p38, or c-Jun NH(2)-terminal kinase is required for intercellular adhesion molecule-1 expression mediated by interleukin-1beta: involvement of sequential activation of tyrosine kinase, nuclear factor-kappaB-inducing kinase, and IkappaB kinase 2. *Mol Pharmacol* **58**: 1479-1489
- Chen MP, Chung FM, Chang DM, Tsai JC, Huang HF, Shin SJ, Lee YJ (2006) Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **91**: 295-299
- Cipollone F., Chiarelli F., Davi G., Ferri C., Desideri G., Fazia M., Iezzi A., Santilli F., Pini B., Cuccurullo C., Tumini S., del Ponte A., Santucci A., Cuccurullo F., Mezzetti A. (2005) Enhanced soluble CD40 ligand contributes to endothelial cell dysfunction in vitro and monocyte activation in patients with diabetes mellitus: effect of improved metabolic control. *Diabetologia* **48**: 1216-1224
- Cohnheim, J. (1889). Lectures on general pathology: a handbook for practitioners and students. *Inflammation* **V**: 242-344 *London: The New Sydenham Society.*

- Collins T (1993) Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest* **68**: 499-508
- Collins T and Cybulsky MI (2001) NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* **107**: 255-264
- Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* **9**: 899-909
- Cominacini L, Fratta Pasini A, Garbin U, Davoli A, De Santis A, Campagnola M, Rigoni A, Zenti MG, Moghetti P, Lo Cascio V (1995) Elevated levels of soluble E-selectin in patients with IDDM and NIDDM: relation to metabolic control. *Diabetologia* **38**: 1122-1124
- Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli Gatti C, Joch H, Volpe M, Luscher TF (2003) High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* **107**: 1017-1023
- Couffinhal T, Duplaa C, Moreau C, Lamaziere JM, Bonnet J (1994) Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **74**: 225-234
- Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G (1992) A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 9991-9995
- Crook MA, Tutt P, Simpson H, Pickup JC (1993) Serum sialic acid and acute phase proteins in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* **219**: 131-138
- Cybulsky MI and Gimbrone MA, Jr (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* **251**: 788-791
- Cybulsky MI, Fries JW, Williams AJ, Sultan P, Davis VM, Gimbrone MA, Jr, Collins T (1991) Alternative splicing of human VCAM-1 in activated vascular endothelium. *Am J Pathol* **138**: 815-820
- Cybulsky MI, Fries JW, Williams AJ, Sultan P, Eddy R, Byers M, Shows T, Gimbrone MA, Jr, Collins T (1991) Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7859-7863
- Davies, M.J., Gordon, J.L., Gearing, A.J., Pigott, R., Woolf, N., Katz, D., Kyriakopoulos, A. (1993) The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *The Journal of pathology* **171**: 223-229.
- de Fougerolles AR and Springer TA (1992) Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J Exp Med* **175**: 185-190
- de Fougerolles AR, Stacker SA, Schwarting R, Springer TA (1991) Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J Exp Med* **174**: 253-267
- Degitz K, Li LJ, Caughman SW (1991) Cloning and characterization of the 5'-transcriptional regulatory region of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *J Biol Chem* **266**: 14024-14030
- Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995) Independent human

MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**: 682-685

Devaraj S., Jialal I. (2000) Low-density lipoprotein postsecretory modification, monocyte function, and circulating adhesion molecules in type 2 diabetic patients with and without macrovascular complications: the effect of alpha-tocopherol supplementation. *Circulation* **102**:191-196

Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT) (2003) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* **329**:977-986.

Diamond MS, Staunton DE, de Fougerolles AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, Springer TA (1990) ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* **111**: 3129-3139

Dilley RJ and Little PJ (2008) Another piece of cell biology in the puzzle of inflammation, glucose and diabetic vascular disease. *J Hypertens* **26**: 396-398

Durante W., Sen A.K., Sunahara F.A. (1988) Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol* **94**:463-468.

Dustin ML and Springer TA (1988) Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* **107**: 321-331

Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA (1986) Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* **137**: 245-254

Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, Lobb RR (1990) VCAM-1

on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* **60**: 577-584

El-seweidy MM, El-Sweify SE, Ameen RS, Hashem RM (2002) Effect of age receptor blocker and/or anti-inflammatory coadministration in relation to glycation, oxidative stress and cytokine production in stz diabetic rats. *Pharmacol Res* **45**: 391-398

Erbağci A.B., Tarakçioğlu M., Coşkun Y., Sivasli E., Sibel Namiduru E. (2001) Mediators of inflammation in children with type I diabetes mellitus: cytokines in type I diabetic children. *Clin Biochem* **34**:645-650

Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliari L, Ceriello A, Giugliano D (2002) Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* **106**: 2067-2072

Fasching P, Veitl M, Rohac M, Streli C, Schneider B, Waldhausl W, Wagner OF (1996) Elevated concentrations of circulating adhesion molecules and their association with microvascular complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **81**: 4313-4317

Fawcett J, Holness CL, Needham LA, Turley H, Gatter KC, Mason DY, Simmons DL (1992) Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* **360**: 481-484

Fiebig E, Ley K, Arfors KE (1991) Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. *Int J Microcirc Clin Exp* **10**: 127-144

Fogelstrand L, Hulthe J, Hulten LM, Wiklund O, Fagerberg B (2004) Monocytic expression of CD14 and CD18, circulating adhesion molecules and inflammatory markers in women with diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetologia* **47**: 1948-1952

- Fong JC, Kao YS, Tsai H, Ho LT (2001) Endothelin-1 increases glucose transporter GLUT1 mRNA accumulation in 3T3-L1 adipocytes by a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Cell Signal* **13**: 491-497
- Frostegard J, Wu R, Haegerstrand A, Patarroyo M, Lefvert AK, Nilsson J (1993) Mononuclear leukocytes exposed to oxidized low density lipoprotein secrete a factor that stimulates endothelial cells to express adhesion molecules. *Atherosclerosis* **103**: 213-219
- Galkina E., Ley K. (2006) Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephro* **17**:368-77
- Gao L, Wang F, Wang B, Gong B, Zhang J, Zhang X, Zhao J (2006) Cilostazol protects diabetic rats from vascular inflammation via nuclear factor-kappa B-dependent down-regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression. *J Pharmacol Exp Ther* **318**: 53-58
- Garg U.C., Hassid A. (1989) Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* **83**:1774-1777.
- Gearing AJ, Hemingway I, Pigott R, Hughes J, Rees AJ, Cashman SJ (1992) Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1: pathological significance. *Ann N Y Acad Sci* **667**: 324-331
- Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP (1990) Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* **343**: 757-760
- Gimbrone MA, Jr, Bevilacqua MP, Cybulsky MI (1990) Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion in inflammation and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* **598**: 77-85
- Gotsch U, Jager U, Dominis M, Vestweber D (1994) Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhes Commun* **2**: 7-14
- Grau AJ, Bugge F, Becher H, Werle E, Hacke W (1996) The association of leukocyte count, fibrinogen and C-reactive protein with vascular risk factors and ischemic vascular diseases. *Thromb Res* **82**: 245-255
- Greve JM, Davis G, Meyer AM, Forte CP, Yost SC, Marlor CW, Kamarck ME, McClelland A (1989) The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* **56**: 839-847
- Grilli M, Chiu JJ, Lenardo MJ (1993) NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* **143**: 1-62
- Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC, Jr, Sowers JR (1999) Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* **100**: 1134-1146
- Guo RW, Yang LX, Li MQ, Liu B, Wang XM (2006) Angiotensin II induces NF-kappa B activation in HUVEC via the p38MAPK pathway. *Peptides* **27**: 3269-3275
- Guzik TJ, Mangalat D, Korbout R (2006) Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol* **57**: 505-528
- Haffner SM. (1998) Issues in management: the role of insulin in cardiovascular outcomes. *Diabetes Metab Rev* **14** Suppl 1:S51-56.
- Haliday EM, Ramesha CS, Ringold G (1991) TNF induces c-fos via a novel pathway requiring conversion of arachidonic acid to a lipoxigenase metabolite. *EMBO J* **10**: 109-115

- Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**: 808-811
- Han J, Lee JD, Jiang Y, Li Z, Feng L, Ulevitch RJ (1996) Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J Biol Chem* **271**: 2886-2891
- Hession C, Tizard R, Vassallo C, Schiffer SB, Goff D, Moy P, Chi-Rosso G, Luhowskyj S, Lobb R, Osborn L (1991) Cloning of an alternate form of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1). *J Biol Chem* **266**: 6682-6685
- Hiraki Y, Rosen OM, Birnbaum MJ (1988) Growth factors rapidly induce expression of the glucose transporter gene. *J Biol Chem* **263**: 13655-13662
- Hopfner R.L., Gopalakrishnan V.: Endothelin (1999) emerging role in diabetic vascular complications. *Diabetologia* **42**:1383-1394.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* **95**: 2409-2415
- House SD and Lipowsky HH (1987) Leukocyte-endothelium adhesion: microhemodynamics in mesentery of the cat. *Microvasc Res* **34**: 363-379
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES (2006) Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* **440**: 944-948
- Hynes RO (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11-25
- Iademarco MF, McQuillan JJ, Rosen GD, Dean DC (1992) Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* **267**: 16323-16329
- Igarashi M, Hirata A, Yamaguchi H, Sugae N, Kadamoto-Antsuki Y, Nozaki H, Jimbu Y, Tominaga M (2007) Characterization of activation of MAP kinase superfamily in vasculature from diabetic rats. *J Atheroscler Thromb* **14**: 235-244
- Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. **84**:9265-9269.
- Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI (1999) Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res* **85**: 199-207
- Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL (1973) Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* **52**: 2757-2764
- Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Emeis JJ, Nijpels G, Dekker JM, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD (2000) Increased levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 are associated with risk of cardiovascular mortality in type 2 diabetes: the Hoorn study. *Diabetes* **49**: 485-491
- Jiang B and Brecher P (2000) N-Acetyl-L-cysteine potentiates interleukin-1 $\beta$  induction of nitric oxide synthase : role of p44/42 mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* **35**: 914-918
- Johnston GI, Cook RG, McEver RP (1989) Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell* **56**: 1033-1044
- Johnstone M.T., Creager S.J., Scales K.M., Cusco J.A., Lee B.K., Creager M.A. (1993) Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients



with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* **88**:2510-2516.

Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK (1986) Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* **6**: 131-138

Jones DA, Abbassi O, McIntire LV, McEver RP, Smith CW (1993) P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. *Biophys J* **65**: 1560-1569

Jones MN and Nickson JK (1981) Monosaccharide transport proteins of the human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* **650**: 1-20

Joneson T, Fulton JA, Volle DJ, Chaika OV, Barsagi D, Lewis RE (1998) Kinase suppressor of Ras inhibits the activation of extracellular ligand-regulated (ERK) mitogen-activated protein (MAP) kinase by growth factors, activated Ras, and Ras effectors. *J Biol Chem* **273**: 7743-7748

Joost HG and Thorens B (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* **18**: 247-256

Kado S and Nagata N (1999) Circulating intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* **46**: 143-148

Kado S, Nagase T, Nagata N (1999) Circulating levels of interleukin-6, its soluble receptor and interleukin-6/interleukin-6 receptor complexes in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* **36**: 67-72

Kado S, Wakatsuki T, Yamamoto M, Nagata N (2001) Expression of intercellular adhesion molecule-1 induced by high glucose

concentrations in human aortic endothelial cells. *Life Sci* **68**: 727-737

Kaiser N, Sasson S, Feener EP, Boukobza-Vardi N, Higashi S, Moller DE, Davidheiser S, Przybylski RJ, King GL (1993) Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes* **42**: 80-89

Karin M (1999) How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* **18**: 6867-6874

Kasahara M and Hinkle PC (1977) Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J Biol Chem* **252**: 7384-7390

Kasapis C and Thompson PD (2005) The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *J Am Coll Cardiol* **45**: 1563-1569

Kim JA, Berliner JA, Natarajan RD, Nadler JL (1994) Evidence that glucose increases monocyte binding to human aortic endothelial cells. *Diabetes* **43**: 1103-1107

King H, Aubert R.E, Herman W.H. (1998) Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* **21**:1414-1431.

Kolyada AY and Madias NE (2001) Transcriptional regulation of the human iNOS gene by IL-1beta in endothelial cells. *Mol Med* **7**: 329-343

Kriegelstein C.F., Granger D.N. (2001) Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* **14**: 44S-54S

Kubes P., Suzuki M., Granger D.N. (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:4651-4655.

Kuldo JM, Westra J, Asgeirsdottir SA, Kok RJ, Oosterhuis K, Rots MG, Schouten JP, Limburg PC,

- Molema G (2005) Differential effects of NF- $\kappa$ B and p38 MAPK inhibitors and combinations thereof on TNF- $\alpha$ - and IL-1 $\beta$ -induced proinflammatory status of endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**: C1229-39
- Kyriakis JM and Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**: 807-869
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**: 156-160
- Lafuente N, Matesanz N, Azcutia V, Romacho T, Nevado J, Rodriguez-Manas L, Moncada S, Peiro C, Sanchez-Ferrer CF (2008) The deleterious effect of high concentrations of D-glucose requires pro-inflammatory preconditioning. *J Hypertens* **26**: 478-485
- Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF, Geltosky JE, Altieri DC (1993) Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell* **73**: 1423-1434
- Lasky LA, Singer MS, Yednock TA, Dowbenko D, Fennie C, Rodriguez H, Nguyen T, Stachel S, Rosen SD (1989) Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. *Cell* **56**: 1045-1055
- Lawrence MB and Springer TA (1991) Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* **65**: 859-873
- Lee JD, Ulevitch RJ, Han J (1995) Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **213**: 715-724
- Leeuwenberg JF, Smeets EF, Neefjes JJ, Shaffer MA, Cinek T, Jeunhomme TM, Ahern TJ, Buurman WA (1992) E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology* **77**: 543-549
- Lenardo MJ and Baltimore D (1989) NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* **58**: 227-229
- Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J (1993) Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol* **122**: 1079-1088
- Li J.M., Shah A.M. (2004) Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**: 1014-1030
- Liao HL, Zhu Y, Wang N, Verna L, Stemerman MB (2000) Selective activation of endothelial cells by the antioxidant pyrrolidine dithiocarbamate: involvement of C-jun N-terminal kinase and AP-1 activation. *Endothelium* **7**: 121-133
- Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT (1996) Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol* **7**: 330-335
- Lin FS, Lin CC, Chien CS, Luo SF, Yang CM (2005) Involvement of p42/p44 MAPK, JNK, and NF-kappaB in IL-1 $\beta$ -induced ICAM-1 expression in human pulmonary epithelial cells. *J Cell Physiol* **202**: 464-473
- Liu W, Schoenkerman A, Lowe WL, Jr (2000) Activation of members of the mitogen-activated protein kinase family by glucose in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**: E782-90
- Lo YY and Cruz TF (1995) Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor

- induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem* **270**: 11727-11730
- Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA (1993) Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest* **92**: 559-570
- Lorenzi M (1992) Glucose toxicity in the vascular complications of diabetes: the cellular perspective. *Diabetes Metab Rev* **8**: 85-103
- Lu H, Raptis M, Black E, Stan M, Amar S, Graves DT (2004) Influence of diabetes on the exacerbation of an inflammatory response in cardiovascular tissue. *Endocrinology* **145**: 4934-4939
- MacKenzie CJ, Ritchie E, Paul A, Plevin R (2007) IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  function in TNF $\alpha$ -stimulated adhesion molecule expression in human aortic smooth muscle cells. *Cell Signal* **19**: 75-80
- Manabe K, Shirahase H, Usui H, Kurahashi K, Fujiwara M (1989) Endothelium-dependent contractions induced by angiotensin I and angiotensin II in canine cerebral artery. *J Pharmacol Exp Ther* **251**: 317-320
- Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L (2003) Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev* **83**: 183-252
- Manning AM, Lu HF, Kukiela GL, Oliver MG, Ty T, Toman CA, Drong RF, Slightom JL, Ballantyne CM, Entman ML (1995) Cloning and comparative sequence analysis of the gene encoding canine intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Gene* **156**: 291-295
- Maraldi T, Rugolo M, Fiorentini D, Landi L, Hakim G (2006) Glucose transport activation in human hematopoietic cells M07e is modulated by cytosolic calcium and calmodulin. *Cell Calcium* **40**: 373-381
- Marette A, Richardson JM, Ramlal T, Balon TW, Vranic M, Pessin JE, Klip A (1992) Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. *Am J Physiol* **263**: C443-52
- Marlin SD and Springer TA (1987) Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* **51**: 813-819
- Martin MU and Falk W (1997) The interleukin-1 receptor complex and interleukin-1 signal transduction. *Eur Cytokine Netw* **8**: 5-17
- Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* **92**: 1866-1874
- McCourt PA, Ek B, Forsberg N, Gustafson S (1994) Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan. *J Biol Chem* **269**: 30081-30084
- McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, Crocker J, Barnett AH, Kumar S (2002) Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 2407
- Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA (1993) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* **12**: 2005-2015
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW (1997) Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- $\alpha$ , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 4196-4200

- Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. (1988) The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* **12**:365-372.
- Morigi M., Angioletti S., Imberti B., Donadelli R., Micheletti G., Figliuzzi M., Remuzzi A., Zoja C., Remuzzi G. (1998) Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF- $\kappa$ B-dependent fashion. *J Clin Invest* **101**:1905-1915
- Moriwaki Y., Yamamoto T., Shibutani Y., Aoki E., Tsutsumi Z., Takahashi S., Okamura H., Koga M., Fukuchi M., Hada T. (2003) Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetes nephropathy. *Metabolism* **52**:605-608.
- Moyer CF, Sajuthi D, Tulli H, Williams JK (1991) Synthesis of IL-1  $\alpha$  and IL-1  $\beta$  by arterial cells in atherosclerosis. *Am J Pathol* **138**: 951-960
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* **229**: 941-945
- Mueckler M (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* **219**: 713-725
- Muñoz C, Castellanos MC, Alfranca A, Vara A, Esteban MA, Redondo JM, de Landazuri MO (1996) Transcriptional up-regulation of intracellular adhesion molecule-1 in human endothelial cells by the antioxidant pyrrolidine dithiocarbamate involves the activation of activating protein-1. *J Immunol* **157**: 3587-3597
- Murad F (1986) Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* **78**: 1-5
- Myers CL, Wertheimer SJ, Schembri-King J, Parks T, Wallace RW (1992) Induction of ICAM-1 by TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , and LPS in human endothelial cells after downregulation of PKC. *Am J Physiol* **263**: C767-72
- Myrup B, de Maat M, Rossing P, Gram J, Kluft C, Jespersen J (1996) Elevated fibrinogen and the relation to acute phase response in diabetic nephropathy. *Thromb Res* **81**: 485-490
- Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, Jr, Gimbrone MA, Jr (1994) Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* **94**: 885-891
- Nappo F, Esposito K, Cioffi M, Giugliano G, Molinari AM, Paolisso G, Marfella R, Giugliano D. (2002) Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *J Am Coll Cardiol* **39**:1145-1150.
- Neish AS, Williams AJ, Palmer HJ, Whitley MZ, Collins T (1992) Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J Exp Med* **176**: 1583-1593
- Nemeth ZH, Deitch EA, Szabo C, Hasko G (2002) Hyperosmotic stress induces nuclear factor- $\kappa$ B activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells. *Am J Pathol* **161**: 987-996
- Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I  $\kappa$ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* **398**: 252-256
- Nishio Y, Kashiwagi A, Taki H, Shinozaki K, Maeno Y, Kojima H, Maegawa H, Haneda M, Hidaka H, Yasuda H, Horiike K, Kikkawa R (1998) Altered activities of transcription factors and their related gene expression in cardiac tissues of diabetic rats. *Diabetes* **47**: 1318-1325
- Nortamo P, Li R, Renkonen R, Timonen T, Prieto J, Patarroyo M, Gahmberg CG (1991) The expression

of human intercellular adhesion molecule-2 is refractory to inflammatory cytokines. *Eur J Immunol* **21**: 2629-2632

O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* **92**: 945-951

Ockenhouse CF, Tegoshi T, Maeno Y, Benjamin C, Ho M, Kan KE, Thway Y, Win K, Aikawa M, Lobb RR (1992) Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med* **176**: 1183-1189

Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, Lobb R (1989) Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* **59**: 1203-1211

Osborn L, Vassallo C, Benjamin CD (1992) Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternately spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. *J Exp Med* **176**: 99-107

Otsuki M, Hashimoto K, Morimoto Y, Kishimoto T, Kasayama S (1997) Circulating vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in atherosclerotic NIDDM patients. *Diabetes* **46**: 2096-2101

Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999) Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* **100**: 2473-2476

Oyama Y, Kawasaki H, Hattori Y., Kanno M. (1986) Attenuation of endothelium-dependent

relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur J Pharmacol* **132**:75-78

Palmer R.M., Ashton D.S., Moncada S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**:664-666.

Panés J, Kurose I, Rodriguez-Vaca D, Anderson DC, Miyasaka M, Tso P, Granger DN (1996) Diabetes exacerbates inflammatory responses to ischemia-reperfusion. *Circulation* **93**: 161-167

Paumelle R, Tulasne D, Leroy C, Coll J, Vandenbunder B, Fafeur V (2000) Sequential activation of ERK and repression of JNK by scatter factor/hepatocyte growth factor in madin-darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* **11**: 3751-3763

Peiró C., Matesanz N., Nevado J., Lafuente N., Cercas E., Azcutia V., Vallejo S., Rodríguez-Mañas L., Sánchez-Ferrer C.F. (2003) Glycosylated human oxyhaemoglobin activates nuclear factor-kappaB and activator protein-1 in cultured human aortic smooth muscle. *Br J Pharmacol* **140**:681-690

Peiró C, Vallejo S, Gembardt F, Azcutia V, Heringer-Walther S, Rodriguez-Manas L, Schultheiss HP, Sanchez-Ferrer CF, Walther T (2007) Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas: a new target to improve endothelial function. *J Hypertens* **25**: 2421-2425

Pekala P, Marlow M, Heuvelman D, Connolly D (1990) Regulation of hexose transport in aortic endothelial cells by vascular permeability factor and tumor necrosis factor-alpha, but not by insulin. *J Biol Chem* **265**: 18051-18054

Pickup J.C., Chusney G.D., Thomas S.M., Burt D. (2000) Plasma interleukin-6, tumor necrosis factor  $\alpha$  and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sciences* **67**: 291-300

Piconi L, Quagliaro L, Da Ros R, Assaloni R, Giugliano D, Esposito K, Szabo C, Ceriello A

- (2004) Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and interleukin-6 expression in human umbilical endothelial cells in culture: the role of poly(ADP-ribose) polymerase. *J Thromb Haemost* **2**: 1453-1459
- Pober JS, Gimbrone MA, Jr, Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer TA (1986) Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* **137**: 1893-1896
- Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR (1992) Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* **140**: 665-673
- Printseva OY, Peclo MM, Tjurmin AV, Gown AM (1991) A 90-kDa surface antigen of immature smooth muscle cells is ICAM-1. *Am J Physiol* **261**: 21-22
- Purves T, Middlemas A, Agthong S, Jude EB, Boulton AJ, Fernyhough P, Tomlinson DR (2001) A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. *FASEB J* **15**: 2508-2514
- Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuodar G, Ceriello A (2005) Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production. *Atherosclerosis* **183**: 259-267
- Radomski M.W., Palmer R.M, Moncada S. (1987) Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* **2**:1057-1058.
- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* **270**: 7420-7426
- Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ (1996) MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* **16**: 1247-1255
- Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Luscinskas FW (2007) Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res* **101**: 234-247
- Rasmussen L.M., Schmitz O., Ledet T. (2002) Increased expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured endothelial cells exposed to serum from type 1 diabetic patients: no effects of high glucose concentrations. *Scand J Clin Lab Invest* **62**: 485-493
- Ray LB and Sturgill TW (1987) Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 1502-1506
- Read MA, Whitley MZ, Williams AJ, Collins T (1994) NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B- $\alpha$ : an inducible regulatory system in endothelial activation. *J Exp Med* **179**:503-512
- Rice GE and Bevilacqua MP (1989) An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* **246**: 1303-1306
- Robbins DJ, Cheng M, Zhen E, Vanderbilt CA, Feig LA, Cobb MH (1992) Evidence for a Ras-dependent extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6924-6928
- Rosen SD (1993) Cell surface lectins in the immune system. *Semin Immunol* **5**: 237-247
- Rosenstein Y, Park JK, Hahn WC, Rosen FS, Bierer BE, Burakoff SJ (1991) CD43, a molecule

defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature* **354**: 233-235

Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**: 801-809

Ross R (1999) Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**: 115-126

Ruderman NB and Haudenschild C (1984) Diabetes as an atherogenic factor. *Prog Cardiovasc Dis* **26**: 373-412

Rumble J.R., Cooper M.E., Soulis T., Cox A., Wu L., Youssef S., Jasi K.M., Jerums G., Gilbert R.E. (1997) Vascular hypertrophy in experimental diabetes. Role of advanced glycation end products. *J Clin Invest* **99**: 1016-1027

Sanz MJ, Johnston B, Issekutz A, Kubes P (1999) Endothelin-1 causes P-selectin-dependent leukocyte rolling and adhesion within rat mesenteric microvessels. *Am J Physiol* **277**: H1823-30

Schenk H, Klein M, Erdbrugger W, Droge W, Schulze-Osthoff K (1994) Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 1672-1676

Schofield I., Malik R., Izzard A., Austin C., Heagerty A. (2002) Vascular structural and functional changes in type 2 diabetes mellitus: evidence for the roles of abnormal myogenic responsiveness and dyslipidemia. *Circulation* **106**:3037-3043

Shikhman AR, Brinson DC, Valbracht J, Lotz MK (2001) Cytokine regulation of facilitated glucose transport in human articular chondrocytes. *J Immunol* **167**: 7001-7008

Shimizu Y, Newman W, Gopal TV, Horgan KJ, Graber N, Beall LD, van Seventer GA, Shaw S (1991) Four molecular pathways of T cell adhesion

to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. *J Cell Biol* **113**: 1203-1212

Shurtz-Swirski R, Sela S, Herskovits AT, Shasha SM, Shapiro G, Nasser L, Kristal B (2001) Involvement of peripheral polymorphonuclear leukocytes in oxidative stress and inflammation in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **24**: 104-110

Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA, Haslett C, Guthrie LA, Johnston RB,Jr, Henson PM, Worthen GS (1986) Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J Clin Invest* **77**: 1233-1243

Smith CH, Barker JN, Morris RW, MacDonald DM, Lee TH (1993) Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. *J Immunol* **151**: 3274-3282

Soedamah-Muthu SS, Chaturvedi N, Schalkwijk CG, Stehouwer CD, Ebeling P, Fuller JH, The EURODIAB Prospective Complications Study group (2006) Soluble vascular cell adhesion molecule-1 and soluble E-selectin are associated with micro- and macrovascular complications in Type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complications* **20**: 188-195

Sonnenberg A (1993) Integrins and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* **184**: 7-35

Sowers J.R, Epstein M., Frohlich E.D. (2001) Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension* **37**:1053-1059. Spitaler M.M., Graier W.F. (2002) Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. *Diabetologia* **45**:476-494.

Springer T.A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**: 301-314

- Springer TA and Wang JH (2004) The three-dimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion. *Adv Protein Chem* **68**: 29-63
- Srinivasan S, Yeh M, Danziger EC, Hatley ME, Riggan AE, Leitinger N, Berliner JA, Hedrick CC (2003) Glucose regulates monocyte adhesion through endothelial production of interleukin-8. *Circ Res* **92**: 371-377
- Stamler J., Vaccaro O., Neaton J.D., Wentworth D. (1993) Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* **16**: 434-444
- Stanley P, Bates PA, Harvey J, Bennett RI, Hogg N (1994) Integrin LFA-1 alpha subunit contains an ICAM-1 binding site in domains V and VI. *EMBO J* **13**: 1790-1798
- Staunton DE, Dustin ML, Springer TA (1989) Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* **339**: 61-64
- Staunton DE, Merluzzi VJ, Rothlein R, Barton R, Marlin SD, Springer TA (1989) A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell* **56**: 849-853
- Stephan M. (2005) Integrin signaling at a crossroads. *The Scientist* **19**:20
- Stephens JM, Carter BZ, Pekala PH, Malter JS (1992) Tumor necrosis factor alpha-induced glucose transporter (GLUT-1) mRNA stabilization in 3T3-L1 preadipocytes. Regulation by the adenosine-uridine binding factor. *J Biol Chem* **267**: 8336-8341
- Stratton I.M., Adler A.I., Neil H.A.W., Matthews D.R., Manley S.E., Cull C.A., Hadden D., Turner R.C., Holman R.R. (2000) Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* **321**: 405-412
- Strauch UG, Lifka A, Gossler U, Kilshaw PJ, Clements J, Holzmann B (1994) Distinct binding specificities of integrins alpha 4 beta 7 (LPAM-1), alpha 4 beta 1 (VLA-4), and alpha IEL beta 7. *Int Immunol* **6**: 263-275
- Sugama Y, Tiruppathi C, offakidevi K, Andersen TT, Fenton JW, 2nd, Malik AB (1992) Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. *J Cell Biol* **119**: 935-944
- Sugimoto H., Shikata K., Hirata K., Akiyama K., Matsuda M., Kushiro M., Shikata Y., Miyatake N., Miyasaka M., Makino H. (1997) Increased expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in diabetic rat glomeruli: glomerular hyperfiltration is a potential mechanism of ICAM-1 upregulation. *Diabetes* **46**:2075-81
- Sumpio BE, Yun S, Cordova AC, Haga M, Zhang J, Koh Y, Madri JA (2005) MAPKs (ERK1/2, p38) and AKT can be phosphorylated by shear stress independently of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **280**: 11185-11191
- Surapisitchat J, Hoefen RJ, Pi X, Yoshizumi M, Yan C, Berk BC (2001) Fluid shear stress inhibits TNF-alpha activation of JNK but not ERK1/2 or p38 in human umbilical vein endothelial cells: Inhibitory crosstalk among MAPK family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6476-6481
- Swerlick R.A., Lee K.H., Li L.J., Sepp N.T., Wright Caughman S., Lawley T.J. (1992) Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *J Immunol* **149**:698-705
- Takami S, Yamashita S, Kihara S, Kameda-Takemura K, Matsuzawa Y (1998) High concentration of glucose induces the expression of



intercellular adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis* **138**: 35-41

Takata K, Kasahara T, Kasahara M, Ezaki O, Hirano H (1990) Erythrocyte/HepG2-type glucose transporter is concentrated in cells of blood-tissue barriers. *Biochem Biophys Res Commun* **173**: 67-73

Tesfamariam B (1994) Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med* **16**: 383-391

The DECODE study group (1999) European Diabetes Epidemiology Group. Diabetes Epidemiology: Collaborative Analysis of Diagnostic Criteria in Europe: Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. *Lancet* **354**:617-621.

Tipping PG and Hancock WW (1993) Production of tumor necrosis factor and interleukin-1 by macrophages from human atheromatous plaques. *Am J Pathol* **142**: 1721-1728

Tordjman KM, Leingang KA, Mueckler M (1990) Differential regulation of the HepG2 and adipocyte/muscle glucose transporters in 3T3L1 adipocytes. Effect of chronic glucose deprivation. *Biochem J* **271**: 201-207

Touyz R.M., Schiffrin E.L. (2004) Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* **122**:339-352

Traenckner EB, Wilk S, Baeuerle PA (1994) A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. *EMBO J* **13**: 5433-5441

Tschope C, Walther T, Escher F, Spillmann F, Du J, Altmann C, Schimke I, Bader M, Sanchez-Ferrer CF, Schultheiss HP, Noutsias M (2005) Transgenic activation of the kallikrein-kinin system inhibits

intramyocardial inflammation, endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental diabetic cardiomyopathy. *FASEB J* **19**: 2057-2059

Tsuboi H, Ando J, Korenaga R, Takada Y, Kamiya A (1995) Flow stimulates ICAM-1 expression time and shear stress dependently in cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **206**: 988-996

van de Stolpe A and van der Saag PT (1996) Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* **74**: 13-33

van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE (1992) Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* **141**: 1427-1433

Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W, Haegeman G (1998) p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* **273**: 3285-3290

Vásquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Martásek P., Hogg N., Masters B.S., Karoui H., Tordo P., Pritchard K.A. jr. (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:9220-9225

Veelken R., Hilgers K.F., Hartner A., Haas A., Bohmer K.P., Sterzel R.B. (2000) Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **11**: 71-79

von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC (1991) Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7538-7542

- Voraberger G, Schafer R, Stratowa C (1991) Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J Immunol* **147**: 2777-2786
- Wada Y, Otu H, Wu S, Abid MR, Okada H, Libermann T, Kodama T, Shih SC, Minami T, Aird WC (2005) Preconditioning of primary human endothelial cells with inflammatory mediators alters the "set point" of the cell. *FASEB J* **19**: 1914-1916
- Walker PS, Donovan JA, Van Ness BG, Fellows RE, Pessin JE (1988) Glucose-dependent regulation of glucose transport activity, protein, and mRNA in primary cultures of rat brain glial cells. *J Biol Chem* **263**: 15594-15601
- Wellen KE and Hotamisligil GS (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* **115**: 1111-1119
- Weller A, Isenmann S, Vestweber D (1992) Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* **267**: 15176-15183
- Wertheimer E, Sasson S, Cerasi E, Ben-Neriah Y (1991) The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose-regulated protein family of stress-inducible proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2525-2529
- Wertheimer SJ, Myers CL, Wallace RW, Parks TP (1992) Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha and phorbol myristate acetate. *J Biol Chem* **267**: 12030-12035
- Wesche H, Korherr C, Kracht M, Falk W, Resch K, Martin MU (1997) The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases). *J Biol Chem* **272**: 7727-7731
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**: 143-180
- Wierusz-Wysocka B, Wysocki H, Siekierka H, Wykretowicz A, Szczepanik A, Klimas R (1987) Evidence of polymorphonuclear neutrophils (PMN) activation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Leukoc Biol* **42**: 519-523
- Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA (1997) Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 2479-2488
- Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **27**: 1047-1053
- Williams S.B., Cusco J.A., Roddy M.A., Johnstone M.T., Creager M.A. (1996) Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* **27**: 567-574
- Wong CK, Ho AW, Tong PC, Yeung CY, Kong AP, Lun SW, Chan JC, Lam CW (2007) Aberrant activation profile of cytokines and mitogen-activated protein kinases in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Clin Exp Immunol* **149**: 123-131
- Wood IS and Trayhurn P (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* **89**: 3-9
- Wood KM, Cadogan MD, Ramshaw AL, Parums DV (1993) The distribution of adhesion molecules in human atherosclerosis. *Histopathology* **22**: 437-444

- Wright EM (2001) Renal Na(+)-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**: F10-8
- Xin X, Khan ZA, Chen S, Chakrabarti S (2004) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) in glucose-induced and endothelin-mediated fibronectin synthesis. *Lab Invest* **84**: 1451-1459
- Yan ZQ, Sirsjo A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Hansson GK (1999) Augmented expression of inducible NO synthase in vascular smooth muscle cells during aging is associated with enhanced NF-kappaB activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**: 2854-2862
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T (1988) A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels. *J Hypertens Suppl* **6**: S188-91
- Yerneni K.K., Bai W., Khan B.V., Medford R.M., Natarajan R. (1999) Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* **48**: 855-864
- Zerfaoui M, Suzuki Y, Naura AS, Hans CP, Nichols C, Boulares AH (2008) Nuclear translocation of p65 NF-kappaB is sufficient for VCAM-1, but not ICAM-1, expression in TNF-stimulated smooth muscle cells: Differential requirement for PARP-1 expression and interaction. *Cell Signal* **20**: 186-194
- Zhou Z, Connell MC, MacEwan DJ (2007) TNFR1-induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. *Cell Signal* **19**: 1238-1248
- Zorzano A, Wilkinson W, Kotliar N, Thoidis G, Wadzinski BE, Ruoho AE, Pilch PF (1989) Insulin-regulated glucose uptake in rat adipocytes is mediated by two transporter isoforms present in at least two vesicle populations. *J Biol Chem* **264**: 12358-12363

